

Beteiligte Signalwege an der Entstehung der  
Urkeimzellen in *Platynereis dumerilii* (Annelida,  
Polychaeta)

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Anika Lidke  
aus Essen

Marburg/Lahn 2013

Vom Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 28.10.2013 angenommen.

Erstgutachter: Dr. Nicole Rebscher

Zweitgutachter: Prof. Dr. Monika Hassel

Tag der mündlichen Prüfung am 15.11.2013.

Für Jakub und Nicole, ohne die ich das hier nicht geschafft hätte.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	4
1.1 Die Entstehung der Urkeimzellen ist ein wichtiger und sensibler Schritt in der Entwicklung jedes Lebewesens.....	5
1.1.1 Die Entwicklung der Urkeimzellen in <i>Platynereis dumerilii</i> .....	6
1.2 Wie wird die Entstehung der Urkeimzellen gesteuert? .....	9
1.2.1 Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$ , Proteinkinase B und $\beta$ -Catenin .....	9
1.2.2 FGF Signalweg .....	12
1.2.3 MAPK Signalweg .....	13
1.2.4 Notch-Delta Signalweg.....	14
1.3 Estradiol, der Estradiolrezeptor und ihre Wirkung auf Urkeimzellen .....	16
1.3.1 Der Estradiol Signalweg bei Invertebraten. ....	18
1.3.2 Der Estradiolrezeptor in <i>Platynereis</i> .....	18
1.4 Zielsetzung .....	19
2 Material und Methoden .....	20
2.1 Material.....	21
2.1.1 Geräte und Materialien .....	21
2.1.2 Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien .....	21
2.1.3 Antikörper .....	25
2.1.4 Enzyme.....	25
2.1.5 Bakterien und Plasmide .....	26
2.1.6 Primer .....	26
2.1.7 Kits .....	27
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Haltung und Kultivierung von <i>Platynereis dumerilii</i> .....	27



---

2.2.2	Gesamt RNA Isolation mit Tri Reagenz (Ambion) .....	28
2.2.3	Erststrangsynthese .....	29
2.2.4	Polymerase Ketten Reaktion (PCR) .....	29
2.2.5	Agarose Gelelektrophorese .....	30
2.2.6	Gelextraktion.....	30
2.2.7	Ligation von PCR Fragmenten.....	31
2.2.8	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i> .....	31
2.2.9	Plasmidpräparation.....	31
2.2.10	Restriktionsverdau .....	32
2.2.11	Sequenzierung von DNA-Fragmenten .....	32
2.2.12	Sondensynthese .....	33
2.2.13	Northern Blot.....	33
2.2.14	In Situ Hybridisierung.....	35
2.2.15	Immunohistologische Untersuchungen .....	36
2.2.16	Immunohistologische Untersuchungen nach Schneider und Bowerman .....	37
2.2.17	Western Blot .....	37
2.2.18	Proliferations-Essay mit EdU.....	40
2.2.19	Inhibitor- und Hormonbehandlungen.....	40
2.2.20	Auswertung von Inhibitor-/Hormonbehandlungen.....	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Das Steroidhormon 17- $\beta$ -Estradiol erhöht die Anzahl der Urkeimzellen in <i>Platynereis</i> . .....	43
3.1.1	Ermittlung eines geeigneten Lösungsmittels und einer geeigneten Konzentration von Estradiol für weitere Versuche. ....	43
3.1.2	Eine Behandlung mit Estradiol führt nur in einem begrenzten Zeitfenster zu überzähligen Urkeimzellen. ....	46
3.1.3	Der durch Estradiol hervorgerufene Effekt wird durch den Estradiolrezeptor vermittelt. ....	51

3.1.4	Der Nachweis des Estradiolrezeptors mittels Western Blot war erfolglos. ....	53
3.1.5	Durch eine in Situ Hybridisierung (ISH) lässt sich <i>PduER</i> mRNA in 6 h alten Embryonen nachweisen. ....	54
3.1.6	Nach einer Inkubation mit Estradiol entstehen Urkeimzellen später als gewöhnlich. ....	56
3.1.7	Suche nach möglichen Zielgenen der Estradiol Behandlung.....	59
3.1.8	Das Xenoestrogen 17- $\alpha$ -Estradiol erzeugt den gleichen Effekt auf die Anzahl der Urkeimzellen wie Estradiol. ....	60
3.2	AKT und GSK3 $\beta$ sind an der Entstehung von überzähligen Urkeimzellen durch Estradiol beteiligt. ....	61
3.2.1	Der AKT Signalweg wird durch Estradiol aktiviert und führt zu einer erhöhten Urkeimzellen Anzahl.....	62
3.2.2	Der GSK3 $\beta$ Inhibitor Azp erzeugt morphologische Effekte bei den behandelten Larven.....	64
3.2.3	Die Anzahl der Urkeimzellen ändert sich abhängig vom Azp Inkubationszeitraum. ....	65
3.2.4	$\beta$ -Catenin lässt sich nur schwierig in <i>Platynereis</i> Embryonen anfärben.....	69
3.2.5	Immunohistologische GSK3 $\beta$ Färbung bei Embryonen. ....	70
3.3	Der FGFR Inhibitor SU5402 erzeugt eine verringerte Anzahl der Urkeimzellen. ....	70
3.4	Der MAPK Signalweg wird sehr wahrscheinlich nicht durch den Estradiolrezeptor aktiviert. ....	72
3.4.1	Der MAPK Inhibitor UO126 hat keine Auswirkungen auf die Urkeimzellen Anzahl.....	72
3.4.2	Eine kombinierte Behandlung mit UO126 und Estradiol hat eine letale Wirkung auf die Embryonen ....	74
3.5	Der Notch-Delta Signalweg scheint nicht an der Entstehung der Urkeimzellen beteiligt zu sein. ....	75
3.5.1	Die Inhibierung des Notch-Delta Signalweges zeigt keine Auswirkungen auf die Anzahl der Urkeimzellen.....	75
3.6	Response Elements.....	77

---

3.6.1	Estradiol Response Elements (EREs).....	77
3.6.2	Nanos Response Elements (NREs).....	77
3.7	Weitere Ergebnisse.....	78
3.7.1	Sequenzierung des Vasa Plasmids ‚Vasa ClonA‘.....	78
3.7.2	Klonierung und Sequenzierung von <i>Pdu Aktin</i> .....	80
3.7.3	Klonierung und Sequenzierung von <i>Pdu CyclinB1</i> . ....	81
3.7.4	Immunohistochemische Anfärbung von $\alpha$ -Tubulin.....	81
3.7.5	Markierung der Urkeimzellen in Embryonen von <i>Platynereis</i> . ....	82
4	Diskussion .....	84
4.1	Estradiol bewirkt die Entstehung von überzähligen Urkeimzellen.....	85
4.1.1	Hohe Konzentrationen von Estradiol führen zu einer erhöhten Urkeimzellen Anzahl.....	85
4.1.2	Die überzähligen Urkeimzellen entstehen auch noch nach 8 h. ....	86
4.1.3	Die Regulierung des Estradiolrezeptors und die Arretierung der Urkeimzellen bilden die Grenzen einer Behandlung mit Estradiol. ....	86
4.1.4	Estradiol regt die Proliferation der Urkeimzellen an, ist jedoch nicht für deren Entwicklung nötig. ....	88
4.1.5	Aufgrund der geringen Anzahl der Urkeimzellen lassen sich Änderungen auf Transkript-Ebene nach einer Behandlung mit Estradiol nicht nachweisen. ....	89
4.2	Die GSK3 $\beta$ scheint eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Arretierung der Urkeimzellen in <i>Platynereis</i> zu spielen. ....	90
4.2.1	Der AKT-Signalweg steuert die GSK3 $\beta$ bei der Urkeimzellen Entwicklung.....	90
4.2.2	Als Regulator für AKT kommt der FGF Rezeptor in Frage. ....	92
4.2.3	Der FGFR könnte in den Urkeimzellen durch Nanos reguliert werden. ....	93
4.2.4	Die GSK3 $\beta$ könnte über Cycline an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sein. ....	93
4.2.5	Der MAP Kinase Signalweg und der Notch-Delta Signalweg scheinen nicht direkt an der Urkeimzellen Entwicklung in <i>Platynereis</i> beteiligt zu sein.....	94
4.3	Welche Rolle spielt Estradiol in <i>Platynereis</i> ?.....	94
4.3.1	Estradiol ist an der Vitellogenin Synthese beteiligt. ....	95

4.3.2	Der Estradiolrezeptor könnte als Transkriptionsfaktor dienen.....	95
4.3.3	Der Eintritt in die Gametogenese könnte durch Estradiol induziert werden. ....	95
4.4	Xenoestrogene und <i>Platynereis</i> . ....	96
4.5	Ausblick .....	96
5	Referenzen .....	99
6	Anhang .....	108
6.1	Abbildungen.....	109
6.2	Statistik der Estradiolbehandlung.....	110
6.3	Sequenzen.....	111
6.3.1	<i>Pdu Vasa</i> Sequenz aus dem Plasmid ‚Vasa Clon A‘ .....	111
6.3.2	Sequenzvergleich <i>Aktin</i> .....	114
6.3.3	Sequenzvergleich <i>PduCyclinB1</i> .....	116
6.4	Vektorkarten .....	118
6.4.1	pGEM-T Easy Vektor .....	118
6.4.2	pcDNA3 Vektor .....	118
6.4.3	pCMV Sport6 Vektor .....	119
6.5	Abkürzungen.....	120
6.6	Abbildungsverzeichnis .....	121
6.7	Tabellenverzeichnis .....	125
6.8	Tagungen und Veröffentlichungen .....	126
	Prag, 16. - 20. August .....	126
6.9	Wissenschaftlicher Werdegang.....	128
6.10	Danksagung.....	129
6.11	Erklärung .....	130

## Zusammenfassung

Urkeimzellen haben innerhalb eines Organismus eine wichtige Aufgabe, ohne sie kann keine neue Generation entstehen. Ihre Entwicklung muss also einer genauen Regulation unterliegen, da schon kleinste Fehler den Verlust der Fortpflanzungsfähigkeit bedeuten können. Über die an dieser Entwicklung beteiligten Signalwege in *Platynereis dumerilii* war bisher wenig bekannt.

Aufgrund der Tatsache, dass in Vertebraten die Entwicklung der Urkeimzellen durch das Steroidhormon Estradiol beeinflusst werden konnte (Ge et al., 2012; La Sala et al., 2010), wurde untersucht, ob in *Platynereis* ein ähnlicher Effekt vorliegt. Bei der Behandlung mit Estradiol war es zunächst nötig, ein geeignetes Lösungsmittel zu ermitteln. Hierbei erwies sich Ethanol als ungeeignet, da es eine Verringerung der Urkeimzellen Anzahl bewirkte. Daher wurde für alle weiteren Versuche DMSO als Lösungsmittel verwendet. Um eine geeignete Konzentration zu ermitteln, wurden Embryonen von 2 h bis 24 h mit Konzentrationen zwischen 0,0001 µg/ml und 1 µg/ml behandelt. Da bei der höchsten Konzentration bereits morphologische Veränderungen der Larven zu beobachten waren, wurde in allen weiteren Versuchen 0,1 µg/ml Estradiol eingesetzt. Bei allen getesteten Konzentrationen konnten Larven mit mehr als vier Urkeimzellen gefunden werden, der höchste Anteil an beeinflussten Larven mit 35,25 ± 3,4 % trat bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml auf. Ebenso wie Estradiol konnte auch eine Wirkung des Xenoöstrogens Ethinylestradiol auf die Urkeimzellen nachgewiesen werden. Erste Ergebnisse zeigten, dass auch nach einer Behandlung mit Ethinylestradiol die Anzahl der Urkeimzellen anstieg, was ausführlich in der Masterarbeit von Andreas Löwer untersucht wurde (Löwer, 2013).

Eine Behandlung mit Estradiol nach 24 h ergab keine Larven mit erhöhter Urkeimzellen Anzahl. Das Zeitfenster für die Behandlung mit Estradiol ließ sich im Folgenden noch weiter auf 4 h bis 9 h eingrenzen. Die Urkeimzellen ließen sich nur während ihrer Entstehung durch Estradiol beeinflussen. Der Estradiolrezeptor Inhibitor ICI182 780 konnte den durch das Estradiol erzeugten Effekt blockieren. Dies zeigt, dass der Estradiolrezeptor an der Erhöhung der Urkeimzellen Anzahl beteiligt ist. Um zu zeigen, zu welchem Zeitpunkt der Estradiolrezeptor in *Platynereis* nachzuweisen ist, wurden Westernblots mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt, die jedoch alle keine eindeutige Bande entsprechender Größe detektieren konnten. Im Gegensatz dazu war der Nachweis der Estradiolrezeptor mRNA in 6 h alten Embryonen erfolgreich: Der

Rezeptor konnte durch eine In Situ Hybridisierung in den Mikromeren des Embryos nachgewiesen werden.

Anhand des Proliferationsmarkers EdU konnte gezeigt werden, dass nach einer Behandlung mit Estradiol auch noch nach 8 h Urkeimzellen entstehen, anstatt wie normalerweise zwischen 6 h und 8 h. Ob der Ursprung der überzähligen Urkeimzellen in den Mesoblasten, oder aber den Urkeimzellen liegt, konnte auf diesem Weg nicht gezeigt werden, jedoch scheint es wahrscheinlich, dass ihr Ursprung in den Urkeimzellen liegt.

Der Versuch mögliche Zielgene des Estradiol Signalweges mit Hilfe von RT PCR aufzuzeigen, war aufgrund der geringen Anzahl der Urkeimzellen im Embryo jedoch nicht möglich.

Wurde zunächst noch davon ausgegangen, dass die überzähligen Urkeimzellen durch einen genomischen Signalweg des Estradiolrezeptors zustande kamen, so zeigte der Einsatz eines Proteinkinase B (AKT) Inhibitors, dass es sich um das sogenannte ‚Rapid Signaling‘ handelte (Moriarty et al., 2006). Die gleichzeitige Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  Inhibitor und 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Estradiol von 6 h bis 8 h erzeugte 79  $\pm$  4,2 % Larven mit vier Urkeimzellen. Der AKT Inhibitor alleine führte zu Larven 35  $\pm$  28 % mit verringerter Anzahl der Urkeimzellen. Der AKT Signalweg scheint also an der Entstehung der Urkeimzellen beteiligt zu sein.

Als mögliches Ziel der AKT kam die Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) in Frage. Ihre Beteiligung an der Entwicklung der Urkeimzellen wurde mit Hilfe des GSK3 $\beta$  Inhibitors Azakenpaullon (Azp) untersucht. Azp erzeugte in den eingesetzten Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  konzentrationsabhängige morphologische Effekte bei den Larven. Die Larven entwickelten einen kugelförmigen Körper, der hauptsächlich aus Kopfregion zu bestehen schien. Zusätzlich dazu konnte jedoch auch ein Effekt auf die Urkeimzellen Anzahl beobachtet werden. Eine Behandlung während der Entstehung des Mesoblasten 4d (4 h bis 5 h) sorgte für eine verringerte Anzahl der Urkeimzellen, während eine spätere Behandlung von 5,5 h bis 6,5 h zu einem Anstieg der Urkeimzellen Anzahl führte. Die GSK3 $\beta$  scheint neben AKT eine wichtige Rolle bei der Urkeimzellen Entwicklung zu spielen. Diese Untersuchungen wurden von Anita Grund im Rahmen einer Bachelorarbeit weiter vertieft (Grund, 2012). Sie konnte zeigen, dass schon bei einer Konzentration von 0,25  $\mu\text{M}$  überzählige Urkeimzellen entstanden, und bei späteren Behandlungen von 6 h bis 8 h der Effekt sogar noch verstärkt auftrat.

Da  $\beta$ -Catenin ein durch GSK3 $\beta$  reguliertes Protein ist, wurden mit verschiedenen Antikörpern versucht in Embryonen eine Veränderung der GSK3 $\beta$  Aktivität nachzuweisen. In einzelnen Fällen gelang eine immunohistochemische Färbung des  $\beta$ -Catenin, jedoch aufgrund der nicht zuverlässigen Wirkung der Antikörper konnte eine Veränderung der  $\beta$ -Catenin Lokalisation nicht systematisch untersucht werden.

Da der FGF Rezeptor unter anderem AKT aktivieren kann (Kalff and Spencer, 2012), sollte durch den Einsatz des FGFR Inhibitors SU5402 untersucht werden, ob der Rezeptor an der Entstehung der Urkeimzellen beteiligt ist. Der Inhibitor erzeugte in der eingesetzten Konzentration von 10  $\mu$ M Larven mit einer verringerten Anzahl der Urkeimzellen. Eine Verknüpfung von FGFR und AKT könnte in diesem Fall vorliegen. Weiter wurde eine Nanos Response Elements in der untranslatierten 3' Region der Sequenz des FGFR gefunden. Dies könnte bedeuten, dass der FGFR durch den Keimzellmarker Nanos in den Urkeimzellen normalerweise herunterreguliert wird.

Sowohl für den MAP Kinase Signalweg, als auch für den Notch-Delta Signalweg konnten bereits Verbindungen zu FGFR oder GSK3 $\beta$  aufgezeigt werden (Espinosa et al., 2003; Kalff and Spencer, 2012; Kim and Snider, 2011). Die Beeinflussung beider Signalwege mit spezifischen Inhibitoren zeigte jedoch keine Änderungen in der Anzahl der Urkeimzellen. In beiden Fällen wurde bisher nur eine Konzentration ausgetestet, wodurch sich eine Beteiligung der beiden Signalwege bisher nicht ausschließen lässt.

Neben der Untersuchung der an der Urkeimzellen Entwicklung beteiligten Signalwege wurden noch weitere Ergebnisse erzielt. Die komplette Sequenz des *PduVasa* Inserts im Plasmid ‚Vasa ClonA‘ wurde ermittelt. Ebenfalls konnten Fragmente von *PduAktin* und *PduCyclinB1* kloniert und sequenziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die Färbung von  $\alpha$ -Tubulin mit Hilfe eines entsprechenden Antikörpers dazu eignet, um als mögliche Gegenfärbung zu  $\beta$ -Catenin zu fungieren. Da sich die Färbung des Vasa Proteins bei Embryonen als schwierig erwies, wurde zudem versucht, die Urkeimzellen in Embryonen durch Kernfärbungen mit DAPI oder Propidium Jodid sichtbar zu machen. Da die Urkeimzellen jedoch nur sehr schwierig im Embryo zu finden sind, und nach kurzer Zeit in den Embryo einwandern, konnte dies nicht bewerkstelligt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass Estradiol eine proliferative Wirkung auf die Urkeimzellen von *Platynereis* hat. Weiterhin konnte ein Modell aufgestellt werden, das eine mögliche Beteiligung und Verknüpfung von FGFR, AKT und GSK3 $\beta$  bei der Entwicklung der Urkeimzellen beinhaltet.

# **1 Einleitung**



## 1.1 Die Entstehung der Urkeimzellen ist ein wichtiger und sensibler Schritt in der Entwicklung jedes Lebewesens.

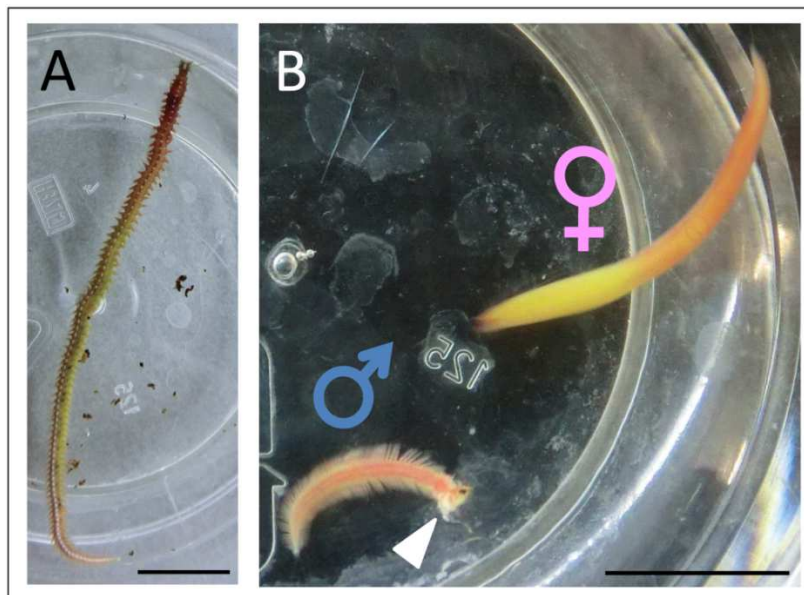
Die Entstehung der Urkeimzellen (UKZ) findet sehr früh in der Entwicklung eines Lebewesens statt. Diese Zellen sind der Ursprung für die Keimzellen, aus denen die nächste Generation entsteht. Dadurch haben sie eine besondere Aufgabe und unterscheiden sich von den somatischen Zellen des Körpers. Bei der Entstehung der Urkeimzellen gibt es zwei Strategien: Epigenese und Präformation. Bei der Epigenese entstehen die Urkeimzellen aus undifferenzierten Zellen zu einem späteren Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung, wie zum Beispiel in der Maus (McLaren, 2003; Ying and Zhao, 2001). Im Gegensatz dazu entwickeln sich die Urkeimzellen bei der Präformation schon zu einem frühen Zeitpunkt der Embryogenese, wie es bei *Drosophila*, *C.elegans*, *Xenopus* oder *Platynereis dumerilii* gezeigt werden konnte (Ewen-Campen et al., 2010; Lai et al., 2012; Rebscher et al., 2012; Saffman and Lasko, 1999; Wylie, 1999). Die Urkeimzellen zeichnen sich bei der Präformation durch besondere Bestandteile des Plasmas aus, wodurch sie eindeutig als Urkeimzellen identifizierbar sind. Diese Bestandteile werden Keimplasma genannt (Eddy, 1975), und werden bei Zellteilungen den Zellen zugewiesen, aus denen später Urkeimzellen hervorgehen (Megosh et al., 2006; Raz, 2003; Rebscher et al., 2007). Das Keimplasma besteht neben Mitochondrien und Ribosomen aus RNA-reichen Ribonukleoprotein Komplexen, welche an der Organisation und Regulation der Translation in den Keimzellen beteiligt sind. Unter anderem sind Vasa (Extavour et al., 2005; Lasko and Ashburner, 1988; Saffman and Lasko, 1999) und Nanos (Deshpande et al., 1999; Extavour et al., 2005; Gilboa and Lehmann, 2004; Wang et al., 1994) als mRNAs und Proteine Teil dieses Keimplasmas. Die DEAD Box RNA Helikase Vasa hat dabei die Aufgabe, Keimzellen spezifische mRNA aus den RNPs zu entwinden und so für die Translation vorzubereiten, wie Untersuchungen an *Drosophila* zeigen konnten (Carrera et al., 2000; Hay et al., 1988). In vielen Organismen wie *C.elegans*, *Xenopus*, dem Plattwurm *Neobenedenia girellae* oder der Maus konnte gezeigt werden, dass sich ohne Vasa keine oder defekte Urkeimzellen bildeten (Ikenishi and Tanaka, 1997; Ohashi et al., 2007; Spike et al., 2008; Tanaka et al., 2000). Nanos dient als translationaler Repressor und verhindert dadurch die vorzeitige Differenzierung der Urkeimzellen in Gameten oder somatische Zellen, was in *Drosophila* gezeigt werden konnte (Deshpande et al., 1999; Kadyrova et al., 2007). Weiterhin ist Nanos wichtig für die Erhaltung der Urkeimzellen, was in *C.elegans*, Zebrafisch und Maus untersucht wurde (Köprunner et al., 2001; Subramaniam and Seydoux, 1999; Tsuda et al., 2003). Es ist

wichtig, dass die Urkeimzellen in einem undifferenzierten Zustand verbleiben, da eine vorzeitige Differenzierung in vielen Fällen zu einem Verlust der Keimzellen und damit der Fähigkeit zur Fortpflanzung führt (Campolo et al., 2013; Gilboa and Lehmann, 2004; Watanabe et al., 2013).

Neben weiteren Proteinen wie Pumillo, Piwi oder Tudor (Ewen-Campen et al., 2010) ist nicht viel über die Entwicklung von Urkeimzellen bekannt. Über mögliche beteiligte Signalwege sind nur in wenigen Organismen Daten vorhanden. Der marine Polychaet *Platynereis dumerilii* bietet sich als Modellorganismus für die Untersuchung der Urkeimzellen Entwicklung an, da die Urkeimzellen sich sehr gut detektieren lassen, und ihre Entstehung gut zu dokumentieren ist.

### 1.1.1 Die Entwicklung der Urkeimzellen in *Platynereis dumerilii*

*Platynereis dumerilii* ist ein gut beschriebener und erforschter mariner Organismus (Ackermann et al., 2005; Fischer et al., 2010; Wilson, 1892). Es handelt sich bei dem Anneliden um einen sehr urtümlichen Organismus, der viele Merkmale aufweist, die auch dem Urbilaterier zugeschrieben werden (Raible et al., 2005). Die Tiere lassen sich im Labor problemlos in künstlichem Seewasser und mit einem simulierten Tag-Nacht-Rhythmus halten. Der Lebenszyklus der Tiere lässt sich grob in drei Phasen aufteilen: Die Entwicklung der Larve hin zu einem juvenilen Wurm, der sich schließlich zu einem geschlechtsreifen Tier entwickelt.



**Abbildung 1: Unreife und geschlechtsreife Tiere lassen sich gut voneinander unterscheiden.** (A) Bevor *Platynereis dumerilii* geschlechtsreif werden sehen Männchen und Weibchen gleich aus. (B) Erst nach der Entwicklung zum geschlechtsreifen Tier lassen sich die Männchen und Weibchen gut auseinander halten. Die Pfeilspitze markiert aus dem Männchen austretendes Sperma. Der Maßstab entspricht jeweils 1,5 cm.

Die Fortpflanzung von *Platynereis* wird in der Wildbahn über die Mondphasen synchronisiert, welche im Labor anhand einer Lampe, die alle vier Wochen für sieben Tage in der Nachtphase eingeschaltet wird, simuliert wird. Die juvenilen Tiere werden ab einem Alter von etwa 3-6 Monaten geschlechtsreif, und durchlaufen dabei eine morphologische Veränderung. Die rot und weiß gefärbten Männchen lassen sich sehr gut von den gelb gefärbten Weibchen unterscheiden (Abbildung 1).

Die Befruchtung der Eizellen findet im freien Wasser statt, in das die Gameten von den Tieren abgegeben werden. Befruchtete Eizellen bilden eine schützende Gallerte, wodurch sie sich einfach von unbefruchteten Eizellen unterscheiden lassen (Wilson, 1892).

Die Entwicklung der Urkeimzellen lässt sich in *Platynereis* fast lückenlos verfolgen (Rebscher et al., 2007), wodurch der Polychaet einen perfekten Modellorganismus für deren Untersuchung darstellt.

Die Urkeimzellen entwickeln sich, wie auch bei anderen Spiraliern, aus dem D Quadranten des Embryos. Bei dem D Quadranten handelt es sich um die größte der vier Zellen des Embryos nach der zweiten Zellteilung. In einem Alter von 5 h bildet sich die Makromere 4d. Aus dieser gehen zunächst in einer bilateralen Zellteilung die beiden Mesoblasten  $4d^1$  und  $4d^2$  hervor. Diese geben in zwei asymmetrischen Zellteilungen, bei etwa 6,5 h und 7,5 h, je eine Zelle ab, die vier Urkeimzellen (Rebscher et al., 2012).

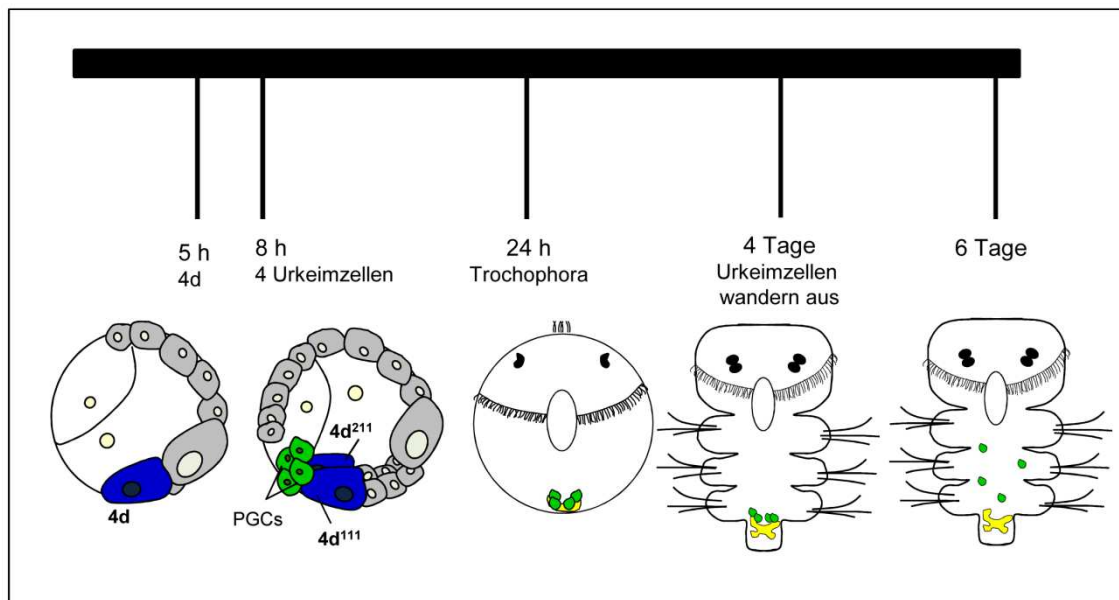
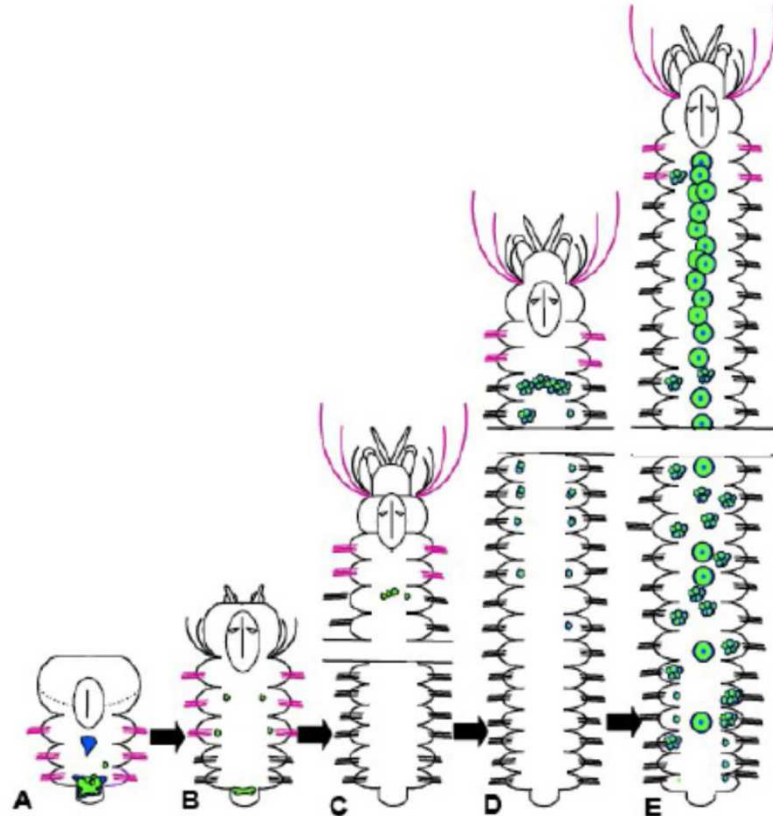


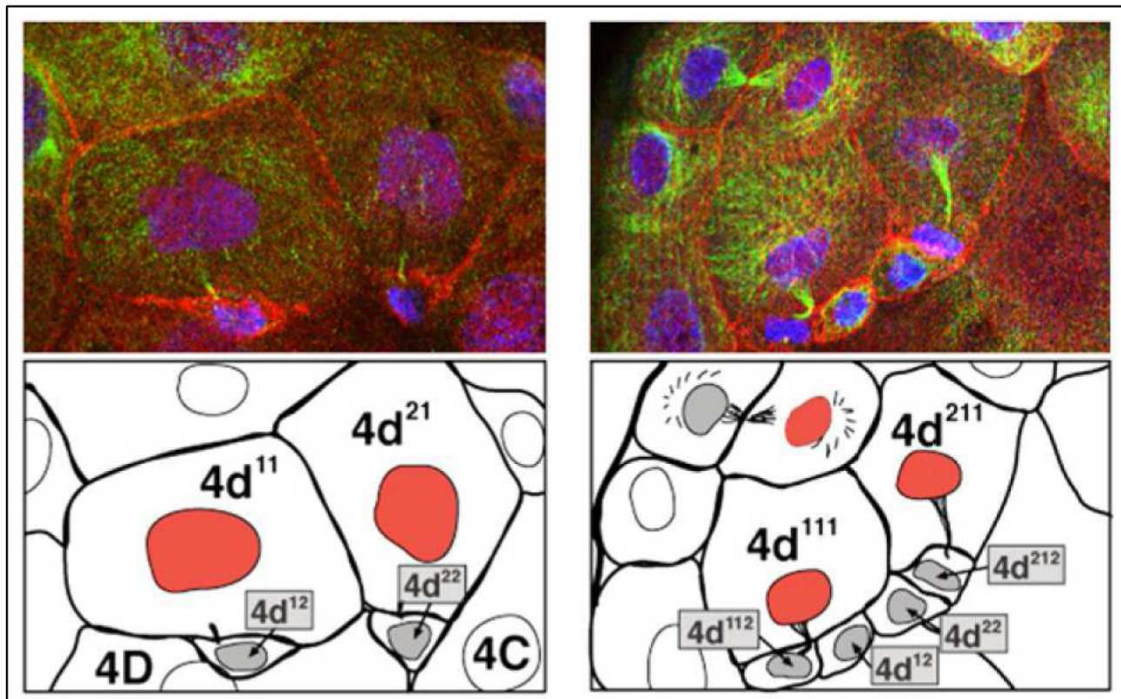
Abbildung 2: Markante Zeitpunkte in der Entwicklung der Urkeimzellen bei *Platynereis*.

Diese vier Urkeimzellen wandern nach Ende der Larvalentwicklung vom posterioren Körperende zur anterior gelegenen primären Gonade, wo sie ruhen bis das Tier eine Körperlänge von etwa 20 Segmenten erreicht hat. Zu diesem Zeitpunkt beginnen die Urkeimzellen in der Gonade zu proliferieren und verlassen die Gonade. Sie verteilen sich über die gesamte Länge des Tieres und beginnen dort Gonien-Cluster zu bilden. Diese dringen in die Leibeshöhle ein und entwickeln sich dort freischwimmend zu Oogonien oder Spermatogonien und schließlich zu Eizellen und Spermien.



**Abbildung 3: Die Entwicklung der Gameten in *Platynereis dumerilii*.** (A) Die vier Urkeimzellen wandern im Alter von 4 Tagen aus der posterioren Wachstumszone aus. (B) Sie wandern zu der primären Gonade im anterioren Teil des Tieres, wo sie bis zu einer Länge von etwa 20 Segmenten verbleiben (C). (D) Die Urkeimzellen proliferieren in der primären Gonade und bilden Gonienbälle, bevor sie in die Leibeshöhle auswandern. (E) In der Leibeshöhle entwickeln sie sich zu Spermien und Eizellen.

Wie in den meisten Organismen erfolgt die Determination der Urkeimzellen in *Platynereis* anhand der Zuteilung von Keimplasma (Rebscher et al., 2012). Darüber hinaus ist über ihre Entstehung und die daran beteiligten Signalwege bisher kaum etwas bekannt. Es gibt jedoch einen ersten Hinweis auf einen regulativen Mechanismus: In den Zellkernen der Urkeimzellen findet sich, im Gegensatz zu den Mesoblasten, kein  $\beta$ -Catenin (Abbildung 4) (Schneider and Bowerman, 2007).



**Abbildung 4:** Bei der Entstehung der Urkeimzellen liegt eine **assymetrische Verteilung von  $\beta$ -Catenin** vor.  $\beta$ -Catenin lässt sich in den Mesoblasten  $4d^{11}$  und  $4d^{21}$ , bzw.  $4d^{111}$  und  $4d^{211}$  im Zellkern nachweisen, jedoch nicht in den Urkeimzellen ( $4d^{12}$ ,  $4d^{112}$ ,  $4d^{22}$ ,  $4d^{212}$ ) (Schneider and Bowerman, 2007).

## 1.2 Wie wird die Entstehung der Urkeimzellen gesteuert?

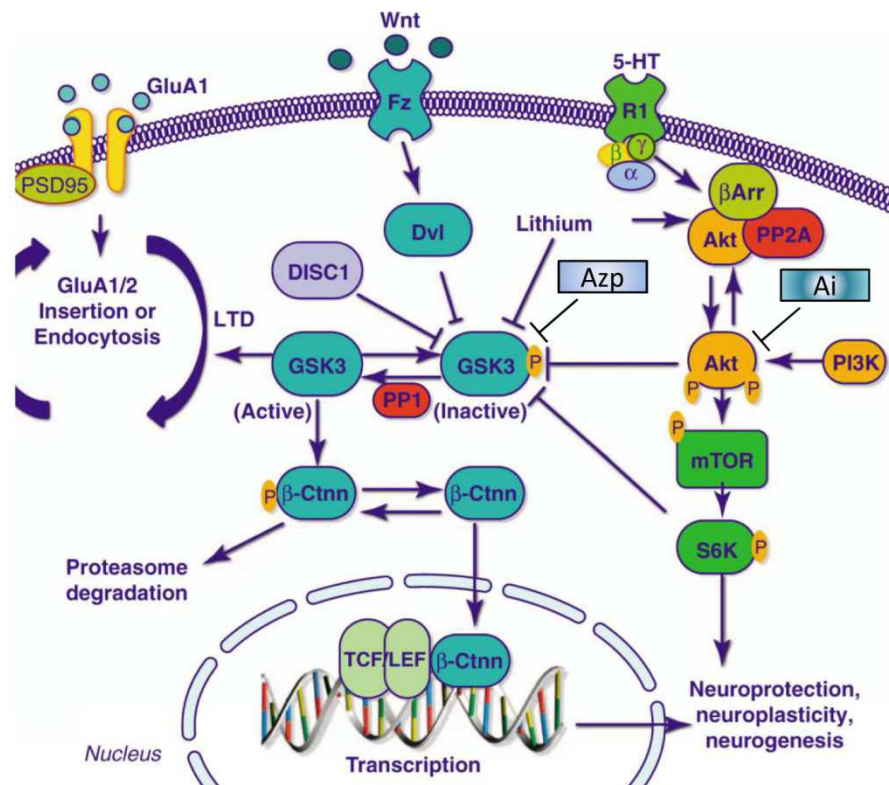
Während die Entstehung der Urkeimzellen in vielen Organismen gut nachvollziehbar ist, ist über die Signalwege die an ihrer Entstehung beteiligt sind nicht viel bekannt. Untersuchungen in verschiedenen Organismen haben Hinweise auf mögliche, an der Entwicklung der Urkeimzellen beteiligte Signalwege gegeben.

### 1.2.1 Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$ , Proteinkinase B und $\beta$ -Catenin

Die Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  steht im Zentrum von verschiedenen Signalwegen. Der kanonische Wnt Signalweg, der nach seinem Liganden benannt ist, ist einer von ihnen (Logan and Nusse, 2004). Eine Beteiligung des Wnt Signalweges an der Bildung der Anterior-Posterior Körperachse konnte in verschiedenen Organismen (zum Beispiel *Xenopus*, Maus, Zebrafisch oder *C.elegans*) aufgezeigt werden (Petersen and Reddien, 2009), weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Signalweg in der Maus an der Regulation von Stammzellen beteiligt ist (Nusse et al., 2008). Im kanonischen Wnt Signalweg bindet der membranständige Rezeptor Frizzled (Fz) extrazelluläres Wnt. Innerhalb der Zelle wird daraufhin durch das Protein Dishevelled (Dvl) die Zusammensetzung eines Komplexes, bestehend aus Axin, dem Adenomatous polyposis coli (APC) Protein und der Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ),

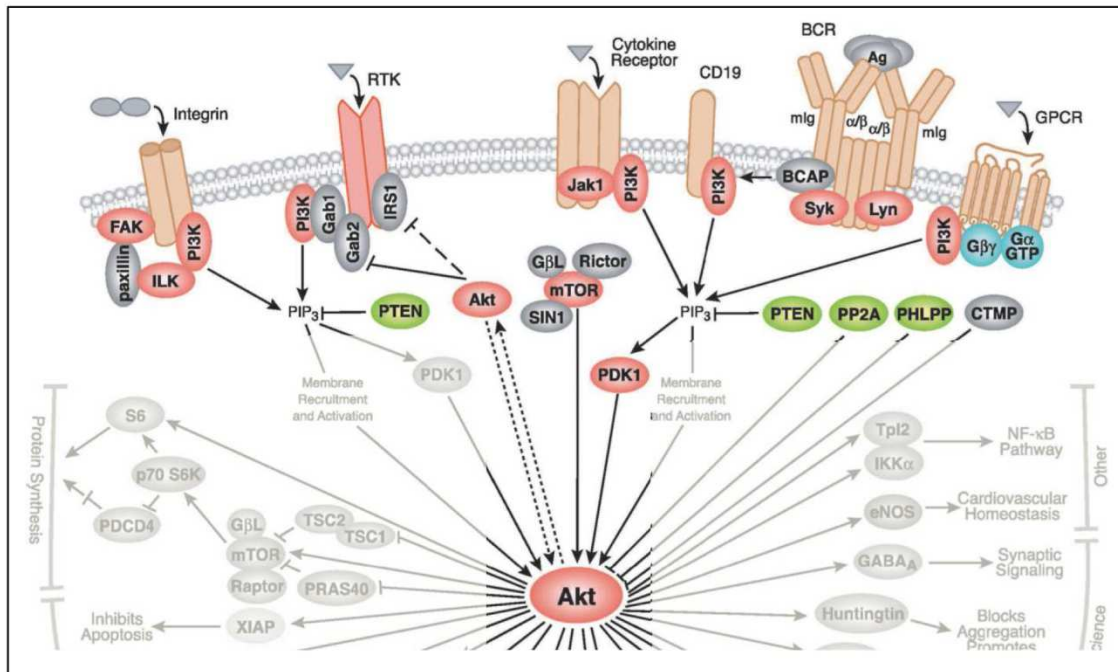


verhindert, wodurch das Protein  $\beta$ -Catenin in den Zellkern einwandern kann. Dort fungiert es zusammen mit LEF/TCF als Transkriptionsfaktor.  $\beta$ -Catenin wird normalerweise von dem aktiven Komplex phosphoryliert und daraufhin im Proteasom degradiert (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Das Zusammenspiel von GSK3 $\beta$ , AKT und  $\beta$ -Catenin.** Verändert nach (Duman and Voleti, 2012).

Neben dem Wnt Signalweg kann die Regulierung der GSK3 $\beta$  und damit auch von  $\beta$ -Catenin ebenfalls durch die Proteinkinase B (AKT) erfolgen (Varea et al., 2010). Die Aktivierung von AKT erfolgt dabei als Signaltransduktion über PI3K, Ausgangspunkt für dieses Signal kann bei unterschiedlichen Rezeptoren liegen (Abbildung 6). Wachstumsfaktor-Rezeptoren kommen dabei genauso in Frage, wie G Protein gekoppelte Rezeptoren (Ge et al., 2012; Kim and Snider, 2011). In Vertebraten konnte nachgewiesen werden, dass eine gesteigerte Proliferation der Urkeimzellen mit einer erhöhten Aktivität der AKT einhergeht (Ge et al., 2012; La Sala et al., 2010).



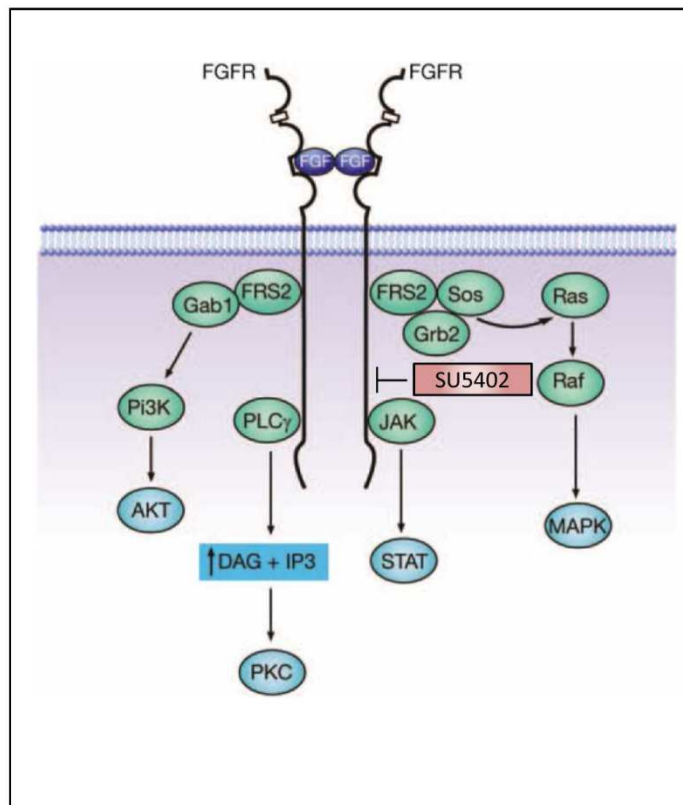
**Abbildung 6: AKT kann durch viele verschiedene Rezeptoren aktiviert werden.** Verändert nach (Emamian, 2012).

Es gibt verschiedene Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von GSK3 $\beta$  und AKT an der Entstehung der Urkeimzellen. In *Hydra* führt der Einsatz des GSK3 $\beta$  Inhibitors Allsterpaullone zu einer Differenzierung der interstitiellen Stammzellen (Khalturin et al., 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch  $\beta$ -Catenin Stammzellen in ihrem undifferenzierten Zustand bleiben (Wend et al., 2010). Ein direkter Zusammenhang zwischen  $\beta$ -Catenin und der Urkeimzellenmenge konnte in Mäusen gezeigt werden; hier wurde durch eine Mutation  $\beta$ -Catenin in den Zellkernen der Urkeimzellen künstlich stabilisiert, wodurch deren Anzahl geringer war als in den Kontrolltieren (Kimura et al., 2006). Die Urkeimzellen im Huhn konnten durch die Aktivierung von AKT und darüber die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin zu Proliferation angeregt werden (Ge et al., 2012), ähnlich wie bei Urkeimzellen von Mäusen, wo gezeigt werden konnte, dass AKT die Proliferation und Differenzierung der Urkeimzellen bewirken kann (Ge et al., 2012; Kimura et al., 2006; La Sala et al., 2010).

Um zu untersuchen, ob an der Entwicklung der Urkeimzellen in *Platynereis* GSK3 $\beta$  oder AKT beteiligt sind, bietet sich der Einsatz von spezifischen Inhibitoren der beiden Kinasen an. Der GSK3 $\beta$  Inhibitor Azakenpaullon (Azp) verhindert, wie der aktive Wnt-Signalweg oder aktive AKT, dass  $\beta$ -Catenin durch den GSK3 $\beta$ /APC/Axin Komplex phosphoryliert und anschließend abgebaut wird. Durch den Einsatz eines AKT Inhibitors kann die Aktivierung der AKT verhindert werden. Als Folge davon könnte die GSK3 $\beta$  aktiviert und  $\beta$ -Catenin degradiert werden.

### 1.2.2 FGF Signalweg

Die Fibroblasten Wachstumsfaktoren (englisch fibroblast growth factor = FGF) gehören zu einer Gruppe Wachstumsfaktoren, die eine wichtige Rolle bei Proliferation und Differenzierung spielen. Der FGF Rezeptor (FGFR) besteht aus drei Bereichen: Die extrazelluläre Domäne mit 3 Immunoglobulin ähnlichen Domänen, der transmembran Domäne und der intrazellulären Domäne zu welcher eine Tyrosin Kinase zählt. Bei der Bindung des Liganden dimerisieren zwei Rezeptoren und es erfolgt eine autokatalytische Phosphorylierung der Tyrosin Kinasen. Eine Weiterleitung des Signals kann nun über verschiedene Wege weiter laufen. Eine Möglichkeit bildet der MAP Kinase Signalweg (1.2.3), welcher über die Membran gebundene GTPase Ras aktiviert wird. Eine weitere Möglichkeit liegt in der Aktivierung der Phosphoinositid 3 Kinase (PI3K), die in vielen Fällen eine Signaltransduktion über AKT einleitet. In den meisten Fällen führt die Aktivierung der FGFR zu einer Transkription spezifischer Zielgene. Diese können unter anderem zum Beispiel mit dem Überleben der Zelle, deren Proliferation, oder dem Erhalt der Pluripotenz zusammenhängen (Ding et al., 2011).



**Abbildung 7: Der FGFR kann verschiedene Signalwege aktivieren.** Der FGFR Inhibitor SU5402 unterbricht die Signaltransduktion am FGFR. Verändert nach (Kalff and Spencer, 2012).

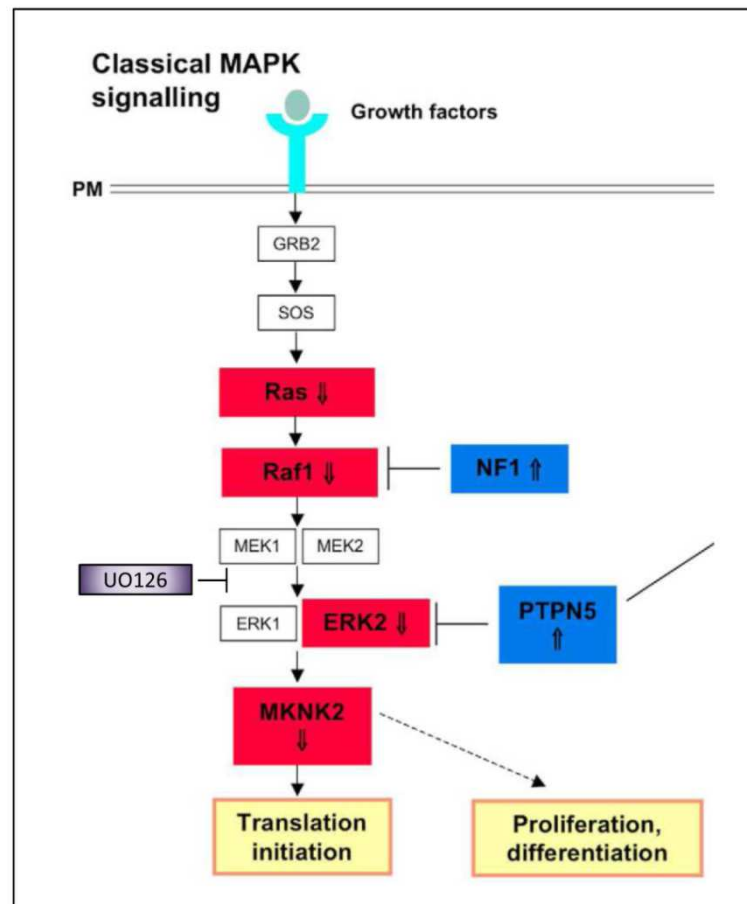


Einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung von Urkeimzellen und dem FGF Signalweg konnte bereits in Axolotl aufgezeigt werden (Johnson et al., 2003). Injektionen von FGF mRNA konnten dort die Bildung von Urkeimzellen induzieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Urkeimzellen der Maus in Zellkultur durch eine Behandlung mit FGF zu erhöhtem Wachstum angeregt werden konnten (Resnick et al., 1998).

Ob eine Verbindung zwischen dem FGFR und der Keimzellen Entwicklung in *Platynereis* besteht, sollte durch den Einsatz des ATP abhängigen FGFR Inhibitor SU5402 untersucht werden. Der Inhibitor verhindert die autokatalytische Phosphorylierung der dimerisierten FGFR, und verhindert dadurch die weitere Signaltransduktion.

### 1.2.3 MAPK Signalweg

Der Mitogen aktivierte Protein (MAP) Kinase Signalweg ist ein mehrstufiger Signaltransduktionsweg, bei dem mindestens drei in Reihe geschaltete Kinasen die jeweils Nächste phosphorylieren und damit aktivieren. Bei den Kinasen handelt es sich um Serin/Threonin Kinasen. Die letzte Kinase in der Reihe aktiviert in den meisten Fällen einen Transkriptionsfaktor, der, wie auch schon bei den anderen vorgestellten Signalwegen, zu einer Transkription spezifischer Zielgene führt. Eine Aktivierung dieser Kinasekaskade kann durch verschiedene Rezeptoren erfolgen; Wachstumsfaktor Rezeptoren wie FGFRs, G Protein gekoppelte Rezeptoren oder Integrine kommen dafür in Frage. Neben den verschiedenen Rezeptoren die den MAPK Signalweg aktivieren können, gibt es auch unterschiedliche Kinasen, die Teil dieser Kinasekette sein können (Wang and Qian, 2010). Diese zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie nicht durch jeden MAPK Inhibitor blockiert werden können.



**Abbildung 8: Der MAPK Signalweg wird durch den Inhibitor UO126 unterbrochen.** Verändert nach (Cox et al., 2010).

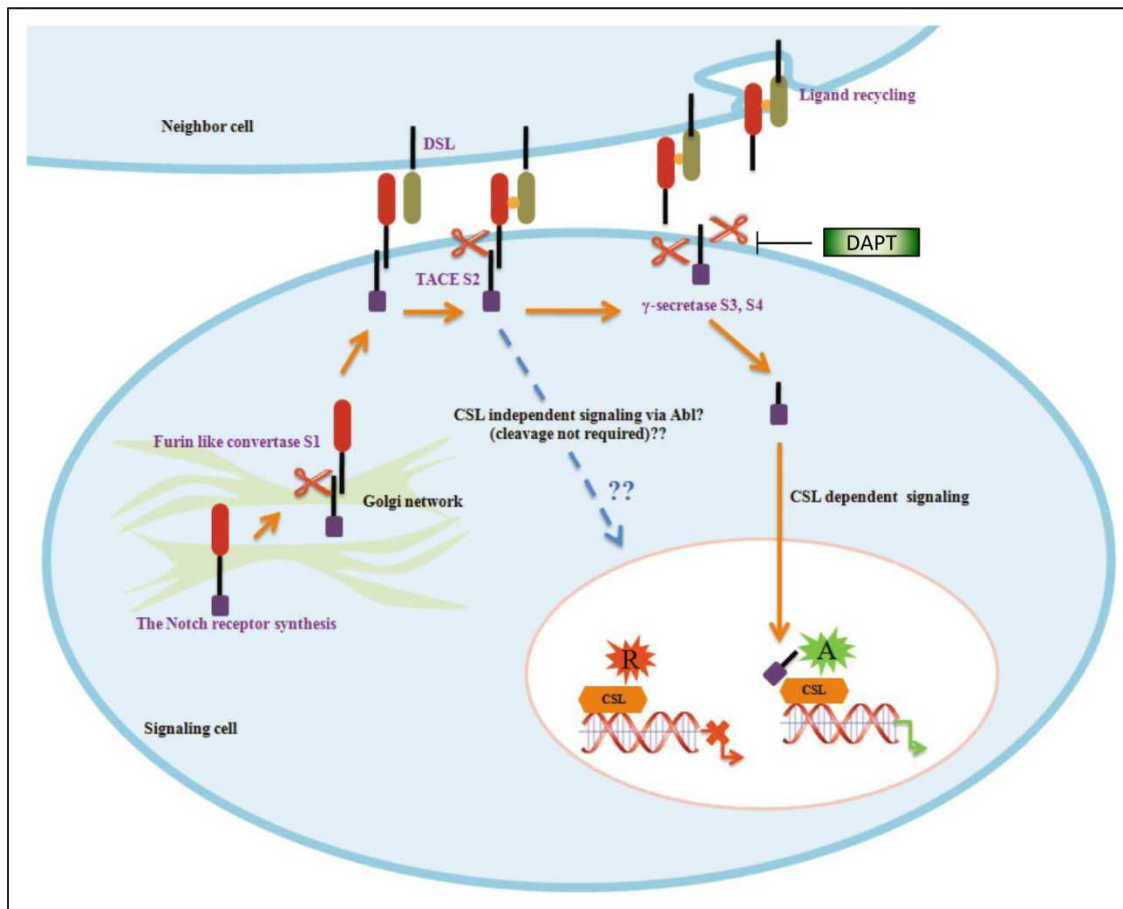
Eine mögliche Verknüpfung der MAP Kinase und der Entwicklung der Urkeimzellen könnte beispielsweise in der Weiterleitung des FGFR Signales liegen (1.2.2). Des Weiteren konnte in *Iliyanassa obsoleta* gezeigt werden, dass der Signalweg für die Entstehung des D-Quadranten, aus dem die Urkeimzellen hervorgehen, notwendig ist (Lambert and Nagy, 2003).

Um die Auswirkungen dieses Signalweges auf die Entwicklung der Urkeimzellen in *Platynereis* zu untersuchen, kann der MAPK Inhibitor UO126 verwendet werden. Dieser verhindert die Phosphorylierung von ERK1 durch MEK (Abbildung 8) und unterbricht dadurch die Signaltransduktion.

#### 1.2.4 Notch-Delta Signalweg

Der Notch-Delta Signalweg gehört zu einem Zell-Zell Kommunikations-Signalweg. Sowohl der Rezeptor Notch als auch der Ligand Delta bestehen jeweils aus einer extrazellulären und einer intrazellulären Domäne. Ligand und Rezeptor befinden sich in unterschiedlichen Zellen und die extrazellulären Domänen können aneinander binden.

Geschieht dies, so wird die intrazelluläre Domäne des Rezeptors durch das Enzym  $\gamma$ -Sekretase abgespalten und wandert in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktor für spezifische Zielgene dient.



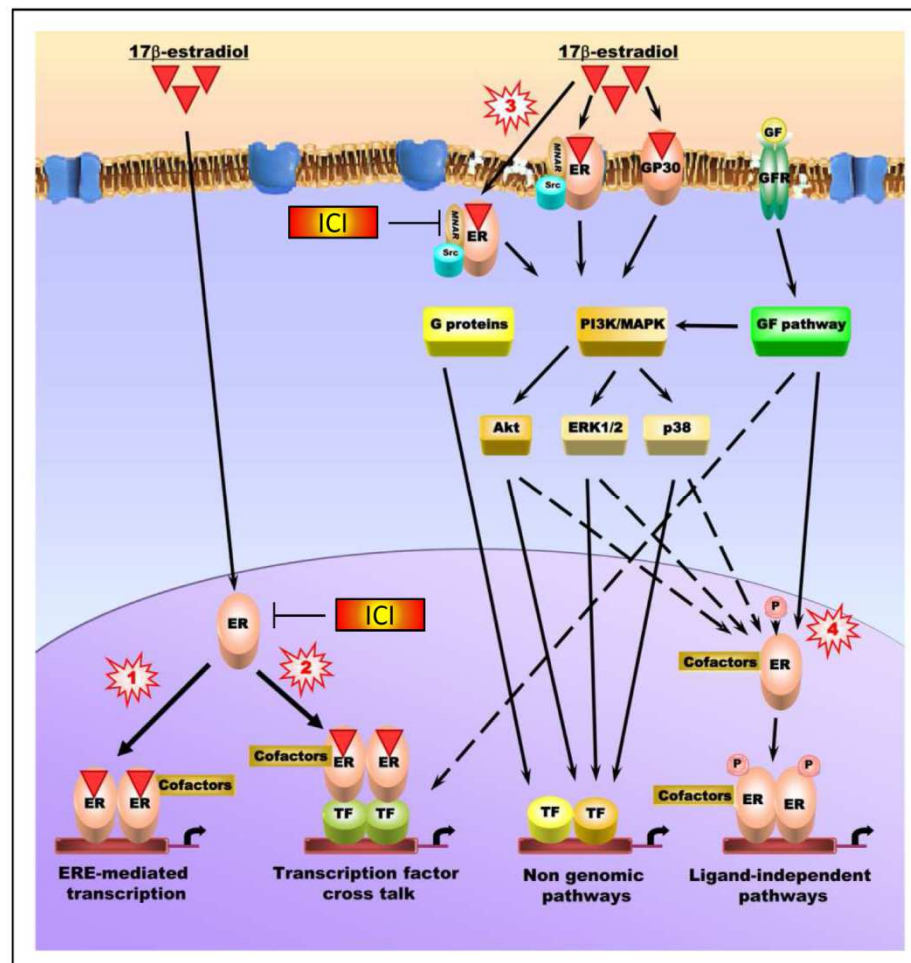
**Abbildung 9: Der  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor DAPT verhindert das Abtrennen der Intrazellulären Domäne von Notch.** Verändert nach (Sassi et al., 2011).

Einen Hinweis auf eine eventuelle Beteiligung des Notch-Delta Signalweges an der Entstehung der Urkeimzellen lässt sich in *Hydra* finden. Es zeigte sich, dass für die Aufrechterhaltung der Interstitiellen Stammzellen der Signalweg benötigt wurde (Khalturin et al., 2007). Daneben konnte auch eine Verknüpfung zwischen dem Notch-Delta Signalweg und der GSK3 $\beta$  aufgezeigt werden (Espinosa et al., 2003).

Um zu untersuchen, ob der Notch-Delta Signalweg an der Entstehung der Urkeimzellen in *Platynereis* beteiligt ist, eignet sich der  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor DAPT. Er unterbricht die Signalweiterleitung dadurch, dass die intrazelluläre Domäne von Notch nicht mehr abgetrennt wird, und damit nicht in den Zellkern einwandern kann.

### 1.3 Estradiol, der Estradiolrezeptor und ihre Wirkung auf Urkeimzellen

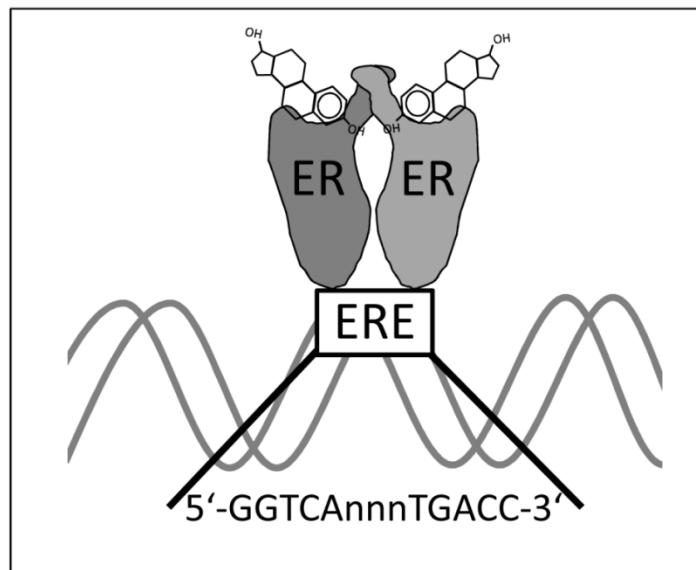
Das Steroidhormon Estradiol ist bekannt dafür, dass es in viele Prozesse involviert ist, die mit der Reproduktion zusammenhängen. Vorgänge wie die Entwicklung von Sexualorganen, die Gametogenese, die Induktion von Vitellogenin, der weibliche Zyklus oder das Paarungsverhalten stehen unter dem Einfluss von Estradiol (Butcher et al., 1974; Gobbetti et al., 1985; Pfaff, 1970; Wallen, 2005). Als klassische Signaltransduktion dient dabei der Estradiolrezeptor (ER).



**Abbildung 10: Der Estradiolrezeptor kann verschiedene Signalwege aktivieren.** Der Estradiolrezeptor Inhibitor ICI unterbricht die Signaltransduktion. Verändert nach (Roman-Blas et al., 2009).

Der ER bindet das Estradiol im Zytoplasma der Zelle, und bildet danach ER-Dimere. Diese wandern in den Zellkern, um dort über Zinkfinger motive an die DNA zu binden (Klug and Schwabe, 1995) und als Transkriptionsfaktoren zu dienen (Klinge, 2000). Die Rezeptoren-Dimere binden dabei an kurze spezifische Sequenz der DNA, die sogenannte ‚Estradiol Response Elementes‘ (EREs). Bei der ERE Sequenz handelt es

sich um eine Abfolge von sechs Nukleotiden, die in einem Abstand von 3 beliebigen Nukleotiden invertiert wiederholt wird (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Schematische Darstellung eines ER-Dimers an einem ERE.**

Die Sequenz scheint hoch konserviert zu sein, humane Zellen ohne EREs in Zellkultur waren nach einer Transfektion mit der ERE Sequenz aus *Xenopus* normal funktionsfähig (Klein-Hitpass et al., 1986). Neben diesem genomischen Signalweg gibt es noch weitere Signalwege, die durch Estradiol ausgelöst werden. Bindet Estradiol an einen membranständigen ER, kann das Signal über verschiedene Kinasen weitergeleitet werden, zu denen unter anderem die MAP Kinase, und AKT zählen (McDevitt et al., 2008). Als dritte Möglichkeit kann Estradiol an G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden, was ebenfalls eine Transduktion über AKT und die GSK3 $\beta$  ermöglicht (Ge et al., 2012; Maggiolini and Picard, 2010). Diese Art der Signaltransduktion wird als ‚Rapid Signaling‘ bezeichnet (Moriarty et al., 2006). Beide Signalwege, die der ER aktivieren kann, lassen sich durch den ER Inhibitor ICI 182,780 (ICI) unterbrechen (La Sala et al., 2010; Leañós-Castañeda and Van Der Kraak, 2007; Notch and Mayer, 2011). ICI bindet an den ER ohne jedoch eine Dimerisierung zweier Rezeptoren, oder das ‚Rapid Signaling‘ zu aktivieren.

Neben der Steuerung der oben erwähnten Prozesse, ließ eine Wirkung von Estradiol auf die Entwicklung von Urkeimzellen nachweisen. Für Urkeimzellen der Maus konnte in vitro ein proliferativer Effekt nachgewiesen werden (La Sala et al., 2010; Moe-Behrens et al., 2003). Zusammen mit der erhöhten Anzahl der Urkeimzellen konnte eine gesteigerte Menge an aktivierten AKT nachgewiesen werden, was bedeutet, dass in diesem Fall nicht der genomische Signalweg ablief, sondern das ‚Rapid Signaling‘.

Ein ähnliches Ergebnis konnte für Urkeimzellen von Hühnern nachgewiesen werden, auch hier wurden die Urkeimzellen von Estradiol über AKT und GSK3 $\beta$  zur Proliferation angeregt (Ge et al., 2012).

### 1.3.1 Der Estradiol Signalweg bei Invertebraten.

Für einen langen Zeitraum galt Estradiol als Vertebraten spezifisches Hormon (Thornton et al., 2003). In Ecdysozoen konnte kein Estradiolrezeptor nachgewiesen werden (Köhler et al., 2007), sondern lediglich ‚Estrogen related receptors‘, die kein Estradiol binden können, wie zum Beispiel in *Drosophila*, der Ameise *Polyrhachis vicina*, oder der Grille *Teleogryllus emma* (He et al., 2010; Laudet, 1997; Ouyang et al., 2009; Ouyang XH, 2009). Daher galt der ER als neue Errungenschaft der Vertebraten. Dies änderte sich, als der erste ER in einem Lophotrochozoen, der Seeschnecke *Aplysia californica*, nachgewiesen wurde (Thornton et al., 2003). Jedoch weder der ER von *Aplysia*, noch der etwas später entdeckte ER von *Octopus vulgaris* waren in der Lage, Estradiol zu binden. Stattdessen waren beide konstitutiv aktiv (Keay et al., 2006; Thornton et al., 2003). Die ERs, die in anderen Lophotrochozoen gefunden wurden (in *Mytilus edulis*, *Patinopecten yessonesis*, *Alitta virens*, *Allita succinea* oder *Platynereis dumerilii*) sind hingegen in der Lage, Estradiol zu binden und ein entsprechendes Signal zu erzeugen (Ciocan et al., 2010; Garcia-Alonso et al., 2011; García-Alonso et al., 2006; García-Alonso and Rebscher, 2005; Keay et al., 2006; Keay and Thornton, 2009; Osada et al., 2004; Thornton et al., 2003). Von allen Lophotrochozoen in denen ERs nachgewiesen werden konnten, sind bisher nur in zwei Organismen Effekte durch eine Behandlung mit Estradiol bekannt. In dem Polychaet *Alitta virens* ist Estradiol an der Vitellogeninsynthese beteiligt, es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Xenoestrogene ebenfalls einen ähnlichen Effekt wie Estradiol haben (Ayoola et al., 2011; Garcia-Alonso et al., 2011; García Alonso, 2005). Die gleiche Funktion, von Estradiol wie in den Polychaeten konnte in der Muschel *Mytilus edulis* nachgewiesen werden; auch hier regt Estradiol die Vitellogeninsynthese an (Ciocan et al., 2010). Weitere Funktionen in anderen Organismen sind bisher nicht bekannt.

### 1.3.2 Der Estradiolrezeptor in *Platynereis*

Der Estradiolrezeptor in *Platynereis* wurde von Keay und Thornton 2009 beschrieben. Er ist in der Lage, Estradiol und verschiedene Xenoestrogene zu binden und als Folge davon eine Signaltransduktion in Gang zu setzen (Keay and Thornton, 2009). Gegenüber der ausführlichen biochemischen Charakterisierung des Rezeptors ist nicht viel über seine Funktion *in vivo* bekannt. In Bezug auf die Urkeimzellen von *Platynereis*

und eine eventuelle Wirkung von Estradiol kann aber gesagt werden, dass sich nach einer Behandlung ab 24 h die Urkeimzellen normal entwickeln (García Alonso, 2005).

## 1.4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es die Entwicklung der Urkeimzellen zu untersuchen, und daran beteiligte Signalwege zu entschlüsseln. Der Einsatz verschiedener Inhibitoren sollte Aufschluss darüber geben, ob ein Signalweg für die Entwicklung notwendig war oder keinen Einfluss darauf hatte. Folgende Inhibitoren wurden dabei verwendet:

- Der GSK3 $\beta$  Inhibitor Azakenpaullone wurde für die Untersuchung des Wnt Signalweges eingesetzt.
- Der ATP abhängige FGFR Inhibitor SU5402 sollte einen Einfluss des FGFR auf die Urkeimzellen ermitteln.
- Um zu zeigen, in wie weit die MAP Kinase Kaskade an der Entstehung der Urkeimzellen beteiligt ist wurde der Inhibitor UO126 eingesetzt.
- Die Wirkung des AKT Inhibitors sollte ebenso eine Beteiligung an der Urkeimzellen Entwicklung aufzeigen.
- Durch den  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor DAPT sollte der Einfluss des Notch-Delta Signalweges auf die Entstehung der Urkeimzellen untersucht werden.

Für alle Inhibitoren galt es, eine geeignete Konzentration, sowie einen geeigneten Zeitraum für die Behandlung zu finden. Im Fokus der Untersuchungen standen drei Zeitpunkte: Die Entstehung von 4d und der Mesoblasten (4 h bis 5 h), die Entstehung der Urkeimzellen (6 h bis 8 h), sowie der Zeitpunkt zu dem die Urkeimzellen zur primären Gonade auswandern (3 bis 4 Tage).

Neben den aufgezählten Signalwegen war auch die Frage zu beantworten, ob Estradiol an der Entwicklung der Urkeimzellen beteiligt ist, oder einen Einfluss darauf nehmen kann. Es galt zu klären, ob eine Behandlung vor 24 h zu einer Veränderung der Urkeimzellen Anzahl führte. Dazu war es erforderlich, eine geeignete Konzentration zu ermitteln sowie gegebenenfalls einen geeigneten Zeitraum für die Behandlung. Weiterhin sollte durch den Estradiolrezeptor Inhibitor ICI182 780 die Notwendigkeit des Estradiolsignals für die Entwicklung der Urkeimzellen untersucht werden. Eine weitere zu untersuchende Fragestellung war, ob sich nach einer Behandlung mit Estradiol Änderungen im Gesamt-Transkript von *Platynereis* aufzeigen lassen, um dadurch von Estradiol regulierte Zielgene ausfindig zu machen. Als mögliche Zielgene kommen dabei Cycline in Frage, die den Zellzyklus regulieren.

## **2 Material und Methoden**



## 2.1 Material

### 2.1.1 Geräte und Materialien

Photometer	Ultrospec®2100; Pro Amersham Pharmacia Biotech
Cycler	PTC-100™; MJ Research, Inc.
Geldokumentation	Biometra UVSolo
Spannungsquelle	Power Pac 300; Biorad
Elektrophoreseapparaturen	Werkstatt, Universität Marburg
Zentrifugen	Biofuge Pico; Heraeus
Elektroporator	Easyjec T; Equibio
Mikroskop	TE200-S; Nikon
KLSM	TCS SP5; Leica
Heizblock	Thermo-Shaker; Universal Labortechnik
Gelelektrophorese Anlage	Biorad, Mini-PROTEAN Tetra Cell for Mini Precast Gels #165-8004, Mini Trans-Blot Module #170-3935,
Entwicklerrmaschine	AGFA Curix 60, Biorad PowerPac™ HC
Filme	Fuji Medical X-Ray Film 100 NIF

### 2.1.2 Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien

Im folgenden Überblick werden verwendete Puffer und Lösungen aufgeführt. Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Applichem, Merck, Roth und Sigma verwendet.

#### RNA Präparation

Tri Reagenz	Ambion # AM9738
-------------	-----------------

#### InSitu Hybridisierung

RNA Marker	RiboRuler High Range RNA Ladder; Thermo Scientific# SM1821
------------	--

#### PCR

dNTPs (2 mM)	Roche
MgCl (25 mM)	Axon
Reaktionspuffer B (10x)	Axon
Taq-Polymerase	5 U/µl; Axon

#### Sondensynthese

10x Dig Labelling Mix	10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-UTP
Lithiumchlorid (LiCl)	4 M in DEPC H <sub>2</sub> O

**Northern Blot**

10x MOPS-Puffer	20,45 g MOPS, 10 ml 0,5 M EDTA pH 8, 2,05 g Na-Acetat, ad 500 ml DEPC H <sub>2</sub> O. pH 7, sterilfiltriert.
20x SSC	175,3 g NaCl, 88,3 g Tri-Natrium-Citrat Dihydrat, ad 1 l ddH <sub>2</sub> O, 0,1 % DEPC. Über Nacht inkubieren, dann autoklavieren.
2x RNA Load	50 % Glycerin, 1 mM EDTA pH 8, 0,4 % Bromphenolblau, 0,4 % Xylencyanol, sterilfiltriert.
Blocklösung	0,5 % Blocking Powder in Waschpuffer
Färbelösung für den Marker	0,02 % Methylenblau in 0,3 M Na-Acetat pH 5,5
Färbepuffer	100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>
NBT/BCIP	Roche
Waschpuffer	100 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl in DEPC H <sub>2</sub> O
Laufpuffer	35 ml 10x MOPS, 62,5 ml Formaldehyd, ad 350 ml DEPC H <sub>2</sub> O
Formaldehyd-Agarosegel	10x MOPS, 0,4 g Agarose, 9 ml Formaldehyd, ad 50,8 ml DEPC H <sub>2</sub> O

**In Situ Hybridisierung**

Blocklösung	5 % Schafserum in PBT
NBT/BCIP	Roche
Hybridisierungslösung	750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natriumcitrat-Di- Hydrat, 50 % Formamid, 100 µg/ml Torula RNA, 1,5 % Blocking Powder, 5 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
PFA (Fixierung)	4 % Paraformaldehyd in 2x PBT
PFA (Nachfixierung)	4 % Paraformaldehyd in PBT

Waschpuffer	100 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1 % Tween 20
Färbepuffer	100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1 % Tween 20

**Agarosegelelektrophorese**

50x TAE Stammlösung	2 M Tris, 1,75 M Essigsäure, 50 mM EDTA; pH 8,0
Agarose	Biozym
DNA Marker	O'GeneRuler DNA Ladder Mix; Thermo Scientific # SM1173
DNA Probenpuffer (6x)	Thermo Scientific
Ethidiumbromid Färbelösung	0,0001 % in ddH <sub>2</sub> O
Gelred Färbelösung	1:50000 in ddH <sub>2</sub> O mit 5mM NaCl; GeneOn # S420

**Bakterien**

Ampicilin	50 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O ; sterilfiltriert
Bakterien Glycerin-Stocks	30 % Glycerin 1:1 mit einer Bakteriensuspension mischen, mit flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei – 80 °C lagern.
IPTG	200 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O; sterilfiltriert
IPTG-X-Gal-Amp LB Agar	400 ml autoklavierten LB Agar auf 60 °C abkühlen lassen, 64 µl IPTG-, 630 µl X-Gal-, und 800 µl Ampicilin-Sammlösung dazu geben und anschließend in sterile Petrischalen gießen.
LB Agar	10 g Agar ad 1 l LB Medium; autoklaviert
LB Amp Medium	50 µg/ml Ampicilin in LB Medium
LB Medium	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l ddH <sub>2</sub> O; autoklaviert
SOB Medium	20 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 0,58 g NaCl, 0,19 g KCl, ad 1 l H <sub>2</sub> O, autoklaviert
SOC Medium	10 ml SOB Medium, 100 µl 2 M Glucose, 100 µl 1 M MgCl <sub>2</sub> , 100 µl 1 M MgSO <sub>4</sub>
X-Gal	20 mg/ml in Dimethylformamid

**Haltung und Versorgung von *Platynereis dumerilii***

Algenmedium	Das Algenmedium wurde nach Hausenschild und Fischer angesetzt (Hausenschild and Fischer, 1969)
Fischfutter	TetraMin, Biospinat
KSW	künstliches Seewasser 4 kg Tropic Marin Meersalz ad 120 l ddH <sub>2</sub> O; pH 8,2 - 8,6

**Inhibitorversuche**

17-β-Estradiol	0,1 mg/ml, in DMSO
17-α-Ethinylestradiol	0,1 mg/ml, in DMSO
AKT 1/2 Inhibitor	5 mM, in DMSO
Azakenpaullone, GSK3-β Inhibitor	5 mM, in DMSO
DAPT, γ-Sekretase Inhibitor	25 mM, in DMSO
ICI 182,780, Estradiolrezeptor Inhibitor	6 mg/ml, in DMSO
UO126, MAPK Inhibitor	20 mM, in DMSO
SU5402, FGFR Inhibitor	10 mM, in DMSO

**Immunohistochemie**

10x PBS Stammlösung	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7, autoklaviert
Blocklösung	5 % hitzeinaktiviertes Schafserum in PBT
Blocklösung nach S&B	5 % hitzeinaktiviertes Schafserum, 0,1 % DMSO, 0,1 % Tween20 und 2 mg/ml BSA in PBT
Dabco Glycerin	2,5 % Diazabicyclo(2,2,2)octan in Glycerin/PBS (9:1)
DAPI	10 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O; Sigma # D9564
Glycinpuffer	2 mg/ml in PBT
PBT	1x PBS mit 0,1 % Tween 20
PFA	4 % Paraformaldehyd in 2x PBT
Propidium Jodid	1 mg/ml

**Westernblot**

10x SDS Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
--------------------	--------------------------------------

Blockpuffer	2 % Bovines Serumalbumin (BSA) in PBT
Bradfordreagenz	Roti®-Quant, Roth #K015.2
BSA-Standart	0,05 mg/ml
ECL	Thermo Scientific # 34075
Homogenisationspuffer	50 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA
Protease Inhibitor	Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich #P2714-1BTL
Protein Marker	PageRuler Prestained Protein Ladder; Thermo Scientific # 26616
Protein Probenpuffer (6x)	0,35 M Tris pH 6,8, 10 % SDS, 36 % Glycin, 5 % $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,012 % Bromphenolblau
SDS Gele	4-20% Mini-PROTEAN TGX Stain-Free, 12-well; Biorad #456-8095
Western Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol

### 2.1.3 Antikörper

Cy3- $\alpha$ -Maus (Schaf)	Sigma # C2181
Cy5- $\alpha$ -Maus (Ziege)	Applied Biological Materials Inc. # SC012
FITC- $\alpha$ -Kaninchen (Ziege)	Sigma # F9887
Peroxidase- $\alpha$ -Kaninchen (Ziege)	Sigma # A 6154
Peroxidase- $\alpha$ -Maus (Ziege)	Sigma # A 9917
$\alpha$ -Human-ER (Kaninchen)	Sigma # E1396
$\alpha$ -Human-ER (Maus)	Santa Cruz Biotechnology # sc-71064
$\alpha$ -Dig.Oxygenin	Roche
$\alpha$ -Human-H3K4 (Kaninchen)	Millipore # 06-598
$\alpha$ -Human- $\beta$ -Catenin (Maus)	Enzo # ALX-804-260
$\alpha$ -Human- $\alpha$ Tubulin (Maus)	Sigma # T5168
$\alpha$ -Maus-ER (Kaninchen)	Novateinbio # AB-A101289
$\alpha$ -Pdu-Vasa (Kaninchen)	Peptide Specialty Laboratories GmbH
$\alpha$ -Xenopus- $\beta$ -Catenin ( $\alpha$ -P14L) (Kaninchen)	(Schneider et al., 1996)

### 2.1.4 Enzyme

Eco321 (EcoRV)	5' – GAT <sup>^</sup> ATC – 3'; Thermo Scientific # ER0302
----------------	--

EcoRI	5' – G <sup>A</sup> AATTC – 3'; Thermo Scientific # ER0272
HindIII	5' – A <sup>A</sup> AGCTT – 3'; Thermo Scientific # ER0502
Proteinase K	20 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O; Roche
SP6 RNA-Polymerase	20 U/μl; Roche
T7 RNA Polymerase	20 U/μl; Roche
XbaI	5' – T <sup>A</sup> CTAGA – 3'; Thermo Scientific # ER0692
XhoI	5' – C <sup>A</sup> TCGAG – 3'; Thermo Scientific # ER0682

### 2.1.5 Bakterien und Plasmide

<i>E. coli</i> XL1 blue	elektrokompetent, recA1, endA1, gyrA96 thi- 1hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqΔM15 Tn10 (Tetr)]
Pd_ER	in pcDNA3
Pd_Vasa	in pCMV•SPORT6

#### Im Verlauf dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Pd_Actin	in pGEM®-T Easy
Pd_Cyclin B	in pGEM®-T Easy

### 2.1.6 Primer

Tabelle 1: Verwendete Primer

Bezeichnung	Tm [°C]	Sequenz
Actin fw	59,3	5' – CAAGCCTCAGCAACTTAAACATCC – 3'
Actin rv	54,7	5' – AACTCTCAATTCATTGTAGAAGGTGT – 3'
Cyclin_B1_fw_68	65,9	5' – GTTTGAAGGAGGCTGTGTTGAAG – 3'
Cyclin_B1_rv_66	70,5	5' – GGTCGGCCAAGGTGAAATTC – 3'
Pd ER spec fw 62	62,1	5' – CAGACCAGTGAACCCAGC – 3'
Pd ER spec rv 60	60,6	5' – TTGGTCATTAACTCCTTCTGG – 3'
SP6	53,2	5' – ATTTAGGTGACACTATAG – 3'
T7	46,9	5' – TAATACGACTCACTATAG – 3'
Vasa clon A fw2 spec 54	58,2	5' – GGTCTCTTCTCATCCACG – 3'
Vasa spec fw1	67	5' – GGAAACCAAGCGCAGTGC – 3'
Vasa spec fw3	57,2	5 – CTGTTGTCCGTTATGTGTTAG – 3'

### 2.1.7 Kits

Click-iT® EdU Alexa Fluor® 594 Imaging Kit; Molecular probes # C10339

Nucleo Spin Extract II; Machery-Nagel # 740609.50

NucleoSpin® Extract Plasmid; Machery-Nagel # 740615.50

pGEM®-T Easy Vector System I; Promega # A1360

RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit; Thermo Scientific # K1631

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Haltung und Kultivierung von *Platynereis dumerilii*

Die Haltung von *Platynereis dumerilii* erfolgte in Plastikschaalen mit einer Grundfläche von 20 x 20 cm und einer Höhe von 6 cm. Die abgedeckten Schalen waren jeweils etwa zur Hälfte mit künstlichem Seewasser (KSW) befüllt und wurden künstlich belüftet. Einmal im Monat fand ein Austausch des Wassers durch frisches KSW statt. Die Temperatur im Kulturraum belief sich konstant auf 18 °C, die Regulation des Tagesrhythmus (16 h Beleuchtung, 8 h Dunkelheit) erfolgte über eine Zeitschaltuhr. Mit einem Abstand von 28 Tagen wurde für sieben Nächte eine zusätzliche Lichtquelle angeschaltet, um eine Vollmondphase zu simulieren, über welche die Tiere ihren Fortpflanzungszyklus regulierten. Etwa eine Woche später konnten die ersten epitoken Tiere aus den Kulturschalen gesammelt und nach Geschlecht getrennt in belüftete Schalen mit KSW überführt werden. Für die Zucht wurden die Tiere in mit KSW befüllte Glasschalen gesetzt, wobei pro Schale ein bis drei weibliche Tiere mit einem männlichen Tier zusammen kamen, um eine Polyspermie bei den befruchteten Eiern zu verhindern. Reguliert durch Pheromone gaben die Tiere ihre Gameten in das Wasser ab, und wurden anschließend aus den Schalen entfernt. War das Gelege befruchtet, bildete sich etwa 20 min später eine Eigallerte. Nach 24 h wurden die schwimmenden Trochophoralarven in Schalen mit frischem KSW überführt. Die Tiere blieben für 3 - 4 Wochen in den Glasschalen, danach wurden sie zusammen mit etwas Algensuspension in Plastikschaalen ohne Belüftung überführt. Ab einem Alter von etwa zwei Monaten wurden die Tiere dann in belüfteten Plastikschaalen gehalten. Nachdem die Tiere etwa einem Monat alt waren, bekamen sie Futter, welches aus zerkleinertem, rohem, tiefgekühltem Bio Spinat, fein zerriebenem Fischfutterflocken und einmal pro Woche zusätzlich einer Algensuspension bestand.

### 2.2.2 Gesamt RNA Isolation mit Tri Reagenz (Ambion)

Die RNA Isolation erfolgte mit Tiere verschiedenen Alters. Es wurden jeweils ganze Gelege verwendet, von denen die Eigallerte vorher durch sorgfältiges Waschen auf einem sehr feinen Sieb zu entfernen war. Die Embryonen oder Larven wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des gesamte KSW aus dem Reaktionsgefäß lagerten die Embryonen und Larven bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei – 80 °C.

Während der Isolation fanden RNase freie Spitzen, Reaktionsgefäße und Lösungen Verwendung. Der zu verwendende Minipistill wurde vor Beginn der Isolation 30 min in 0,1 M NaOH dekontaminiert und anschließend mit DEPC-H<sub>2</sub>O gut gespült. Alle folgenden Schritte wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die gefrorenen Tiere wurden unaufgetaut mit 500 µl TriReagenz versetzt und direkt mit dem Minipistill homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min folgte eine Zentrifugation des Homogenisats für 10 min bei 13.000 rpm. Der klare Überstand wurde dann in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mehrfach mit einer sterilen Spritze durch eine 20 Gauge Kanüle gezogen, um durch die Scherkräfte die Zellen aufzubrechen. Jede Probe wurde mit 100 µl Chloroform versetzt, für 15 sek mit Hilfe eines Vortex gemischt, und 10 min bei RT belassen. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C wurde die wässrige Oberphase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, und die darin enthaltene RNA durch die Zugabe von 250 µl eiskaltem Isopropanol 10 min lang gefällt. Anschließend wurde die RNA 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt, wobei das entstandene RNA Pellet im Reaktionsgefäß verblieb. Durch die Zugabe von 500 µl eiskaltem 75 % Ethanol wurde das Pellet gewaschen und noch einmal für 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach dem restlosen Entfernen des Überstandes wurde das Pellet etwa 5 – 10 min an der Luft getrocknet, bis sämtliches Ethanol verdunstet war. Die RNA wurde schließlich in 15 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen, welches auf 60 °C vorgewärmt war. Nach einer Mengenbestimmung am Photometer erfolgte die Lagerung der RNA in 1 – 5 µg Aliquots bei – 80 °C. Um die Qualität der RNA zu überprüfen wurden 3 µl auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen.



### 2.2.3 Erststrangsynthese

Die Herstellung von cDNA aus isolierter gesamt RNA erfolgte mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, welches gemäß den Herstellerangaben verwendet wurde. Für die cDNA Synthese wurden die oligo(dT)<sub>18</sub> Primer und jeweils 5 µg RNA verwendet.

### 2.2.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Zusammensetzung der Reaktionen erfolgten nach dem Schema aus Tabelle 2:

**Tabelle 2: Zusammensetzung einzelner PCR Reaktionen**

Komponenten	Einfache PCR	Multiplex PCR
Puffer B (10x)	1 µl	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 µl	1 µl
dNTP-Mix (2 mM)	0,5 µl	0,5 µl
Primer <sub>forward</sub> 1 (10 µM)	0,5 µl	0,5 µl
Primer <sub>reverse</sub> 1 (10 µM)	0,5 µl	0,5 µl
Primer <sub>forward</sub> 2 (10 µM)	•	0,5 µl
Primer <sub>reverse</sub> 2 (10 µM)	•	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl	0,1 µl
Template	50 ng	50 ng
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl	ad 10 µl
Gesamtvolumen	10 µl	10 µl

Als Negativkontrolle wurde jeweils zusätzlich ein Ansatz ohne Template, stattdessen mit H<sub>2</sub>O angesetzt.

### 2.2.4.1 Programme

Folgende Programme fanden zur Vervielfältigung einzelner DNA-Fragmente Verwendung:

**Tabelle 3: Verwendete PCR Programme**

Schritt Nr.	„Spec 52“		„Er-Pdu“	
1	95 °C	2 min	95 °C	2 min
2	95 °C	1 min	95 °C	1 min
3	52 °C	1 min	51 °C	1 min
4	72 °C	3 min	72 °C	3 min
5	30 Wiederholungen ab Schritt 2		4 Wiederholungen ab Schritt 2	
6	72 °C	10 min	95 °C	1 min
7	Ende		56 °C	1 min
8			72 °C	3 min
9			25 Wiederholungen ab Schritt 6	
10			72 °C	10 min
11			Ende	

### 2.2.5 Agarose Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in 1 % Agarosegelen mit 1x TAE Puffer. Die Proben wurden mit 6x DNA Probenpuffer versetzt und neben einem DNA Marker auf das Gel geladen. Das Gel lief 45 min bei 100 V – 120 V und wurde zur anschließenden Detektion der DNA 10 min in einer 0,0001 % Ethidiumbromid Lösung oder 20 min in einer Gelred Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert.

### 2.2.6 Gelextraktion

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde das Nucleo Spin Extract II Kit gemäß den Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden die

aufzureinigenden Banden mit Hilfe eines Skalpells aus dem zuvor gelaufenen Agarosegel ausgeschnitten. Abschließend erfolgte mit Hilfe eines Photometers die Feststellung der Konzentration der aufgereinigten DNA.

### **2.2.7 Ligation von PCR Fragmenten**

Mit dem pGEM®-T Easy Vector System Kit wurden durch PCR amplifizierte DNA Fragmente in den pGEM®-T Easy Vector eingebracht. Das Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet, nach der Ligation wurden die Plasmide bei – 20 °C gelagert.

### **2.2.8 Transformation von Plasmiden in *E. coli***

Um Plasmide zu vermehren wurden sie in *E.coli* Bakterien transformiert. Dazu wurden elektrokompente Bakterien verwendet. Ein Aliquot der Bakterien wurde auf Eis schonend aufgetaut und 40 µl der Bakteriensuspension wurden mit 1 – 2 µl Plasmid (etwa 100 ng) gemischt. Unmittelbar danach wurde das Gemisch in eine Elektroporationsküvette gegeben und im Elektroporator elektroporiert. Anschließend wurden die Bakterien mit 1 ml vorgewärmtem SOC Medium versetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Platten ausgestrichen. Die Platten waren dabei mit dem Antibiotikum Ampicilin versehen, um nur erfolgreich transformierten Bakterien ein Wachstum zu ermöglichen. Außerdem waren dem Agar IPTG und X-Gal zugesetzt worden, um anhand einer Blau-Weiß Selektion festzustellen, welche Bakterien ein Plasmid mit erfolgreich ligiertem Insert aufgenommen haben.

### **2.2.9 Plasmidpräparation**

Für die Gewinnung großer Mengen Plasmids, wurden mit entsprechenden Bakterien 5 ml LB-Amp Medium angeimpft. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C und 250 rpm über Nacht in einem Bakterienschüttler. Am folgenden Tag wurden 3 ml von dieser Kultur mit Hilfe des NucleoSpin® Extract Plasmid Kits präpariert. Das Kit wurde gemäß den Anleitungen des Herstellers verwendet. Nach der Präparation wurde die Konzentration der Plasmide mit Hilfe eines Photometers bestimmt und die Plasmide bei – 20 °C gelagert. Zusätzlich wurden die mit Plasmiden transformierten Bakterien 1:1 mit 30 % Glycerin versetzt und als Glycerin Stocks bei – 80 °C gelagert.

### 2.2.10 Restriktionsverdau

Zur Linearisierung von Plasmiden oder um DNA-Fragmente aus einem Plasmid heraus zu schneiden, wurden Restriktionsenzyme verwendet. Sollte ein DNA-Fragment ausgeschnitten werden, wurden bei einigen Plasmiden 2 verschiedene Enzyme benötigt. Der enzymatische Verdau benötigt etwa 3 h um ein Plasmid vollständig zu verdauen. Schneller sind die Fast Digest Enzyme, sie benötigen jeweils nur 10 min. Die Reaktionen wurden wie in Tabelle 4 beschrieben angesetzt. Anschließend wurden die Reaktionen mit DNA Probenpuffer versehen und auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

**Tabelle 4: Pipetierschema Restriktionsverdau**

Komponente	Menge
Plasmid	2 µg
Enzym 1	1 µl
Enzym 2	1 µl
Puffer	2 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl
Gesamtvolumen	20 µl

### 2.2.11 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Zur Analyse einer DNA Sequenz in einem Plasmid wurde das jeweilige Konstrukt an die Firma SeqLab gesendet. Die Probe wurde dabei nach dem Pipetierschema in Tabelle 5 angesetzt. Sequenzen wurden anschließend mit Hilfe der Programme ClustalX und GenDoc verglichen. Über die online Plattform BlastX ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&BLAST\\_PROGRAMS=blastx&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&BLAST_PROGRAMS=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)) wurde nach einer Ähnlichkeit mit Bereichen in veröffentlichten Sequenzen gesucht.

**Tabelle 5: Pipetierschema Sequenzierung**

Komponente	Menge
Plasmid	600 ng
Primer	2 µl
H <sub>2</sub> O	ad 7 µl
Gesamtvolumen	7 µl

### 2.2.12 Sondensynthese

Für die Durchführung einer In Situ Hybridisierung wird eine komplementäre Sonde zur gesuchten Sequenz benötigt. Diese enthält Dig-Oxygenin markiertes Uracil über das die Sonde später detektiert werden kann.

Die Sondensynthese wurde wie in Tabelle 6 beschrieben in einem RNase freien 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt.

**Tabelle 6: Pipetierschema für die Sondensynthese**

Komponente	Menge
DEPC H <sub>2</sub> O	6 µl
10x Transkriptionspuffer bei 37 °C	2 µl
10x Dig. Labeling Mix	1 µl
Template	1 µl
RNA-Polymerase	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Das Reaktionsgefäß wurde über Nacht in ein Wasserbad der Temperatur 37 °C gestellt, wo die Sondensynthese stattfand. Anschließend erfolgte eine Fällung der hergestellten RNA. Dazu wurden 1,25 µl 2 M LiCl und 38 µl eiskaltes 100 % Ethanol zu dem Ansatz gegeben, und dieses entweder über Nacht bei -20 °C, oder für 30 min bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 13.000 rpm für 30 min bei 4 °C. Der Überstand wurde danach vorsichtig entfernt, und das entstandene RNA Pellet mit 500 µl eiskaltem 70 % Ethanol/DEPC H<sub>2</sub>O gewaschen. Eine erneute Zentrifugation bei 13.000 rpm bei 4 °C für 15 min folgte. Der Überstand wurde danach vollständig entfernt, und das Pellet bei RT getrocknet, bis das gesamte Ethanol verdampft war. Für den nächsten Schritt wurde während dessen Nuklease freies H<sub>2</sub>O auf 55 °C erwärmt. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl des aufgewärmten H<sub>2</sub>O gründlich aufgenommen und 5 µl davon wurden in 45 µl Hybridisierungslösung verdünnt. Die verdünnte Sonde wurde bei -20 °C, die unverdünnte bei -80 °C gelagert.

### 2.2.13 Northern Blot

Mit Hilfe eines Northern Blot lässt sich RNA im Anschluss an eine Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. In diesem Fall wurden die Methode genutzt, um die korrekte Größe von RNA-Sonden für die In Situ Hybridisierung nachzuweisen.

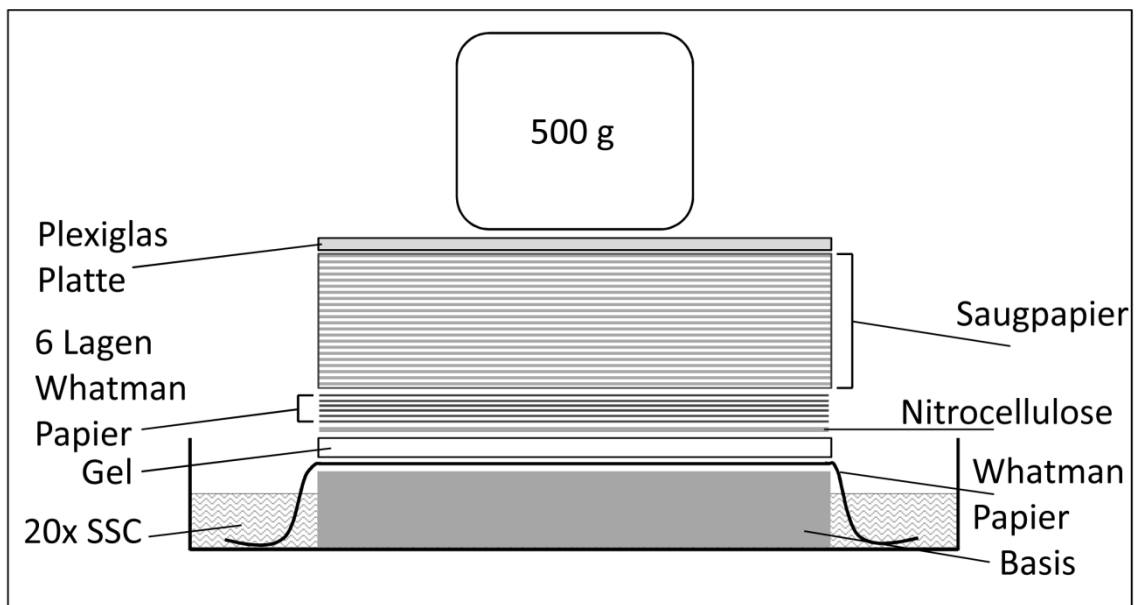
Zunächst wurden für die Gelelektrophorese der Puffertank, der Gelschlitten und der Kamm für 30 min in 0,1 M NaCl dekontaminiert. Anschließend wurde alles mit VE H<sub>2</sub>O

und zuletzt mit DEPC H<sub>2</sub>O abgespült. Als nächstes wurde der Laufpuffer angesetzt und das Formamid-Agarosegel gegossen. Während das Gel etwa 30 min polymerisierte, wurden die Proben und der Marker für die Elektrophorese wie in Tabelle 7 beschrieben in einem 1,5 ml RNase freien Reaktionsgefäß vorbereitet.

**Tabelle 7: Pipetierschema Probenvorbereitung Northern Blot**

Komponente	Sonde	Marker
DEPC H <sub>2</sub> O	4,5 µl	2,5 µl
10x MOPS	1 µl	1 µl
Formaldehyd	3,5 µl	3,5 µl
Formamid	10 µl	10 µl
Sonde/Marker	1 µl	3 µl
Gesamtvolumen	20 µl	20 µl

Die vorbereiteten Proben und der Marker wurde für 15 min auf 55 °C erhitzt und anschließend direkt auf Eis gestellt. Nachdem sie mit 2x RNA Ladepuffer versetzt wurden, wurden sie auf das Gel aufgetragen. Während das Gel bei 40 mA lief, wurde für den Blotaufbau das Whatman Papier zurechtgeschnitten und in SSC eingeweicht. Die Nitrocellulosemembran wurde zurechtgeschnitten und in DEPC H<sub>2</sub>O gewässert und ein etwa 5 cm hoher Stapel Saugpapier wurde vorbereitet. Nach dem Gellauf wurde das Gel für 5 min in DEPC H<sub>2</sub>O gewässert und anschließend der Blot wie in Abbildung 12 gezeigt aufgebaut.



**Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Northern Blots.**

Bei dem Aufbau des Blots wurde darauf geachtet, dass sich zwischen dem Gel, der Nitrocellulosemembran und der 6 Lagen Whatman Papier keine Luftblasen befanden.

Der Blot wurde über Nacht stehen gelassen, und die Membran am nächsten Tag nach dem Abbau zwischen zwei Whatman Papieren für eine Stunde bei 80 °C gebacken. Anschließend wurde die Markerbande abgeschnitten und für 10 min in der Färbelösung angefärbt. Die restliche Membran wurde für 5 min in Waschpuffer gewaschen und dann für eine Stunde in Blocklösung geblockt. Bevor die Membran danach mit dem 1:5000 in Waschpuffer verdünnten Antikörper für 30 min inkubiert wurde, wurde sie erneut für 5 min in Waschpuffer gewaschen. Als nächstes wurde sie für 30 min in Waschpuffer gewaschen. Danach wurde sie für 3 min im Färbepuffer equilibriert, bevor sie mit 10 ml Färbepuffer mit 200 µl NBT/BCIP versetzt wurden. Sobald Banden sichtbar wurden, wurde die Membran aus der Färbelösung genommen, und die Laufstrecke bestimmt.

#### **2.2.14 In Situ Hybridisierung**

Um das Vorkommen von RNA in 6 h alten Embryonen mit Hilfe von Dig-Oxigenen markierten Sonden nachzuweisen, wurde eine In Situ Hybridisierung durchgeführt.

Die Embryonen wurde dazu für eine Stunde in 4 % PFA/2x PBT bei RT fixiert und anschließend in zwei Waschschritten in PBT für 5 min gewaschen. Die Lagerung der fixierten Embryonen erfolgte in Methanol bei -20 °C. Nachdem die Embryonen schrittweise in 75 %, 50 % und 25 % Methanol/PBT für je 5 min rehydriert wurden, erfolgten zwei Waschschrritte in PBT. Durch eine Inkubation mit 100 µg/ml Proteinase K in PBT für 30 sek sollte eine erhöhte Permeabilität erzeugt werden. Durch zwei je 5 min lange Waschschrritte in 2 mg/ml Glycin in PBT wurde die Aktivität der Proteinase abgestoppt. Danach erfolgte eine Nachfixierung der Proben mit 4 % PFA/PBT für 30 min. Im Anschluss daran erfolgten fünf Waschschrritte für je 5 min mit PBT.

Alle folgenden Schritte erfolgten bei 65 °C in einem Wasserbad mit vorgewärmten Lösungen. Die Embryonen wurden für 2 h mit 200 µl Hybridisierungslösung versetzt. Anschließend wurden 10 µl der 1:10 verdünnten Sonde in 100 µl Hybridisierungslösung gegeben. Bevor diese zu den Embryonen gegeben wurde, erfolgte eine Denaturierung der Sonde für 10 min bei 80 °C. Die Embryonen wurden nach Entfernen der Hybridisierungslösung mit der verdünnten Sonde versetzt und über Nacht im Wasserbad belassen. Am nächsten Tag wurde die verdünnte Sonde von den Embryonen entfernt und für einen weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert. Die Embryonen wurden zwei Mal für je 30 min mit 50 % Formamid/20x SSC versetzt. Anschließend wurden sie für 15 min in 2x SSC und zwei Mal je 30 min in 0,2x SSC gewaschen.

Von nun an erfolgten alle weiteren Schritte, wenn nicht anders vermerkt, bei RT. Die Embryonen wurden in 250 µl 5 % Schafserum/PBT für 1 h geblockt, während der  $\alpha$ -Dig Antikörper für die gleiche Zeit 1:2000 verdünnt in 2,5 % Schafserum präabsorbiert wurde. Anschließend wurde die Blocklösung von den Embryonen entfernt, und der präabsorbierte Antikörper dazu gegeben. Die Embryonen wurden über Nacht bei 4 °C belassen und anschließend sechs Mal für 10 min mit PBT bei RT gewaschen. Um die Embryonen auf die Färbung vorzubereiten, wurden sie jeweils zwei Mal für 5 min in Waschpuffer und Färbepuffer gewaschen, bevor sie mit 500 µl Färbelösung (NBT/BCIP Lösung 1:50 in Färbepuffer verdünnt) versetzt wurden. War die gewünschte Färbung erreicht, wurde die Färbereaktion durch drei Waschschrte mit PBT für je 5 min abgestoppt. Die Embryonen wurden anschließend in 80 % Glycerin aufgenommen und auf Objektträger eingebettet. Die Auswertung erfolgte am Nikon Inversions-Fluoreszenzmikroskop.

### **2.2.15 Immunohistologische Untersuchungen**

Für den Nachweis von Proteinen in Tieren verschiedenen Alters wurden unter Verwendung von spezifischen Antikörpern immunohistologische Untersuchungen durchgeführt.

Zu Beginn wurden die Tiere in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 4 % PFA in 2x PBT für 10 min fixiert. Schwimmende Tiere ab einem Alter von 24 h wurden dazu erst mit einem Tropfen der PFA Lösung abgetötet, damit das KSW entfernt werden konnte. Anschließend wurden die Tiere jeweils für 5 min erst in PBT und anschließend in Methanol gewaschen. Sollten die Tiere nicht direkt weiter verarbeitet werden, wurden sie nach diesem Schritt bei – 20 °C gelagert. Um die Tiere nach der Inkubation in Methanol zu rehydrieren, wurden sie jeweils für 5 min in 75 % Methanol/PBT, 50 % Methanol/PBT und 25 % Methanol/PBT gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrte in PBT wurden die Tiere bei RT mit Proteinase K (0,1 mg/ml) verdaut, um eine bessere Zugänglichkeit für die Antikörper zu gewährleisten. Tiere in einem Alter von 6 T wurden 3 min, Larven in einem Alter von 6 h – 10 h wurden für 1 min verdaut. Dem Verdau folgten zwei Inkubationen in Glycin (2 mg/ml) und drei weitere für 5 min in PBT. Nach dem letzten Waschschrte in PBT wurden die Tiere in 0,2 ml Reaktionsgefäße überführt und das PBT durch Blocklösung ersetzt. Nach mindestens 40 min wurde die Blocklösung abgenommen und durch in Blocklösung verdünnte Antikörper ersetzt. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler mit dem Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgenommen, mit einer Endkonzentration von 0,03 % Natriumazid versetzt und bei 4 °C für den



weiteren Gebrauch aufbewahrt. Die Proben wurden fünf Mal für 5 min gewaschen, bevor schließlich der jeweilige fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Zweitantikörper in Blocklösung für 90 min bei RT auf die Proben gegeben wurde. Ab diesem Schritt wurden die Proben dunkel gehalten weiter bearbeitet, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern. Nach fünf weiteren Waschschritten mit PBT für je 5 min wurde das PBT größtenteils abgenommen und die Tiere in DABCO/Glycerin eingebettet. Die Auswertung der Färbung fand sowohl am Nikon Inversions-Fluoreszenzmikroskop, sowie am Leica KLSM statt.

#### Kernfärbung mit DAPI oder PI

Bei immunohistologischen Untersuchungen von Embryonen im Alter von 6 h – 10 h wurde zusätzlich zu der Antikörper-Färbung noch eine Kernfärbung mit DAPI oder PI durchgeführt. Die jeweils verwendete Substanz wurde gemeinsam mit dem Zweit-Antikörper zugegeben. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden wie bei einer normalen Antikörperfärbung durchgeführt.

#### **2.2.16 Immunohistologische Untersuchungen nach Schneider und Bowerman**

Die Färbung von  $\beta$ -Catenin und  $\alpha$ -Tubulin in Embryonen erfolgte nach einem Protokoll nach (Schneider and Bowerman, 2007).

Die Fixierung der Embryonen in einem Alter von 7 h bis 10 h erfolgte über Nacht in 4 % PFA/PBT. Anschließend wurden die Embryonen zwei Mal für 5 min in PBT gewaschen, bevor sie für 1 h in Blocklösung gelagert wurden. Anschließend wurde die Blocklösung durch Antikörper verdünnt in Blocklösung ausgewechselt, und die Embryonen darin über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag erfolgten fünf Waschschrritte in PBT bevor der Zweit-Antikörper zu den Proben gegeben wurde. Ab hier erfolgten alle Schritte wie bei der normalen immunohistologischen Färbung (siehe 2.2.15).

#### **2.2.17 Western Blot**

Als weiterer Nachweis von Proteinen wurden Western Blots durchgeführt. Hierzu wurden Embryonen im Alter von 7 h verwendet.

#### Herstellung des Proteinextraktes

Dafür wurden zunächst die Eigallerte durch sorgfältiges Waschen mit KSW über ein Sieb entfernt. Die Tiere wurden dann in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde alles KSW aus dem

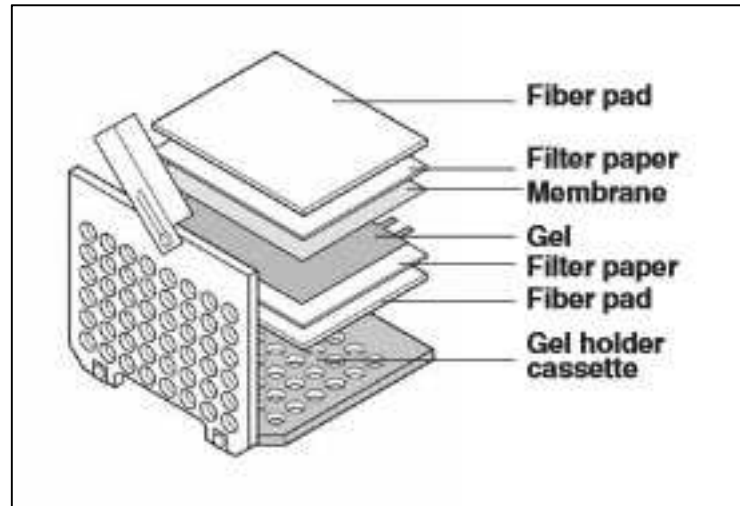
Reaktionsgefäß entfernt und die Embryonen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zu einer weiteren Verarbeitung wurden die Tiere bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Als nächstes wurde mit Proteaseinhibitor versehener Homogenisationspuffer auf Eis gestellt und die gefrorenen Tiere im Reaktionsgefäß in einen Metallblock gestellt. Die Tiere wurden mit  $30\text{ }\mu\text{l}$  eiskaltem Homogenisationspuffer versetzt und mit dem Minipistill sofort homogenisiert. Der so erhaltene Extrakt wurde sofort wieder auf Eis gestellt und leicht vermischt. Es folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 13.000 rpm bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , wonach der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und weiter auf Eis gelagert wurde. Die Proteinkonzentration des Extraktes wurde mit Hilfe eines Photometers ermittelt. Dazu wurde Bradfordreagenz und ein BSA-Standard verwendet.  $5\text{ }\mu\text{l}$  des Proteinextraktes wurden mit  $95\text{ }\mu\text{l}$  Homogenisationspuffer verdünnt, und diese wurden genau wie  $100\text{ }\mu\text{l}$  Homogenisationspuffer und  $100\text{ }\mu\text{l}$  BSA Standard jeweils mit 1 ml der Bradfordreagenz versetzt. Nach 2 min wurden die Absorption bei 595 nm des Standards mit der des Proteinextraktes verglichen und der Proteingehalt des Extraktes errechnet. Der Proteinextrakt konnte an dieser Stelle bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für weitere Verwendung gelagert, oder direkt auf ein SDS Gel aufgetragen werden.

#### SDS Polyacrylamid Gel

Bevor der Proteinextrakt auf ein SDS Polyacrylamid Gel aufgetragen wurde, um ihn der Größe nach aufzutrennen, wurde dieser mit 6x Probenpuffer versetzt und für 3 min auf  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einem Heizblock erhitzt. Unterdessen wurde die Laufkammer mit 1x Laufpuffer befüllt und das Gel in die entsprechende Halterung gespannt und in die Kammer gesteckt. Pro nachzuweisendem Antikörper wurde eine Tasche mit Proteinextrakt befüllt. Zusätzlich wurde eine Tasche pro später verwendetem Zweit-Antikörper als Negativ-Kontrolle mit dem Extrakt befüllt. In jede Tasche wurden etwa  $15\text{ }\mu\text{g}$  Protein aufgetragen. Zusätzlich zum Proteinextrakt wurde eine Tasche des Gels mit  $5\text{ }\mu\text{l}$  Proteinmarker beladen. Das fertig beladene Gel wurde dann bei 100 V – 250 V laufen gelassen, bis die Front des Ladepuffers bis kurz vor die untere Gelkante gelaufen war. Das Gel wurde anschließend vorsichtig von den Platten befreit und zur Detektion der Proteine auf eine UV-Platte gelegt. Im Gel enthaltene Trihalo Verbindungen verbinden sich im UV-Licht mit der Aminosäure Tryptophan in den aufgetrennten Proteinen. Anschließend sind sie durch UV-Licht detektierbar. Die Trihalo-Proteinverbindung bleibt bestehen, und ermöglicht so eine Detektierung der Proteine nach dem Blotten auf der Membran durch UV-Licht.

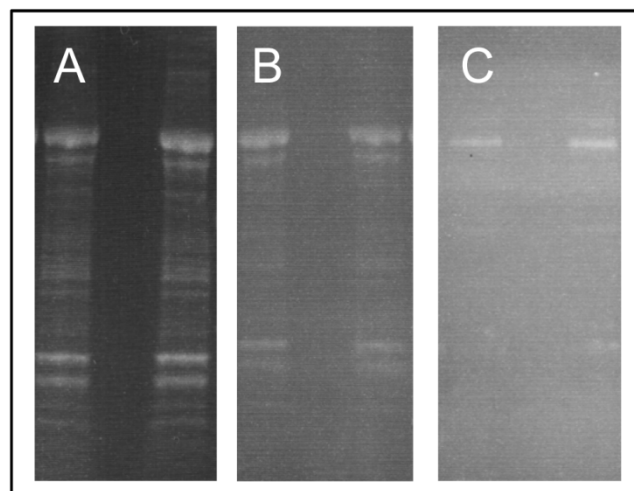
Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran

2 Streifen Whatman Papier und die PVDF Membran wurden zusammen mit den Fiber Pads in eine Schale mit Westerntransferpuffer gelegt. Die Kassette für den Proteintransfer wurde wie in Abbildung 13 gezeigt beladen und zusammengesetzt.



**Abbildung 13: Aufbau für den Proteintransfer (Biorad)**

Die fertig beladene Kassette wurde zusammen mit einer tiefgekühlten Kühleinheit in die Kammer gesteckt, welche anschließend mit Westerntransferpuffer befüllt wurde. Für 1 h wurde eine Spannung von 110 V angelegt. Nach dem Transfer wurde die Membran auf eine UV-Platte gelegt, um die transferierten Proteine auf der Membran nachzuweisen.



**Abbildung 14: Die aufgetrennten Proteine lassen sich durch UV-Licht nachweisen.** Die Trihalo-Protein-Verbindung ermöglicht diese Art des Proteinnachweises. (A) Nach der Elektrophorese sind die Proteine gut im Gel aufgetrennt. (B) Nach dem Blotten ist ein Großteil der Proteine auf der Membran, während sich (C) im Gel nur noch wenige Mengen nachweisen lassen.

### Detektion der Proteine

Die einzelnen mit Proteinextrakt beladenen Spuren und der Marker wurden auseinander geschnitten und jeweils die obere rechte Ecke markiert. Auf diese Weise konnte jede Spur mit einem anderen Antikörper behandelt werden. Zunächst wurden die Streifen jedoch für 1 h bei RT in Blockpuffer inkubiert. Für die Antikörperlösung wurde der Blockpuffer 1:4 in PBT verdünnt und schließlich mit den jeweiligen Antikörpern versetzt und in Plastikfolie eingeschweißt. Die einzelnen Streifen wurden dann über Nacht bei 4 °C mit verschiedenen Antikörpern auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag folgten fünf 5-minütige Waschschriffe der einzelnen Streifen, bevor sie für 90 min mit dem jeweiligen Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper inkubiert wurden. Nach abschließenden 5 Waschschriffen von 5 min wurden die Streifen für 5 min mit ECL Lösung inkubiert. Die Gelstreifen wurden in eine lichtdichte Gelkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurden Röntgenfilme unterschiedlich lange auf die Streifen gelegt und anschließend in der Entwicklermaschine entwickelt.

### **2.2.18 Proliferations-Essay mit EdU**

Als Proliferationsmarker wurde das Thymidin Analogon EdU verwendet, welches während der S-Phase der Mitose in die DNA der Zellen eingebaut wird. EdU wurde für unterschiedliche Zeitspannen dem KSW zugesetzt, und anschließend sorgfältig ausgewaschen. Die Tiere wurden dann mit 6 T fixiert und einer immunhistologischen Untersuchung unterzogen wie in 2.2.15 beschrieben. Nachdem der Zweit-Antikörper inkubiert wurde und die Tiere einmal 5 min lang mit PBT gewaschen waren, wurde das EdU mit dem Click-iT® EdU Alexa Fluor® 594 Imaging Kit gemäß den Herstellerangaben detektiert. Abschließend wurden die Tiere 5 mal 10 min in PBT gewaschen und schließlich mit DABCO/Glycerin eingebettet. Die Auswertung der Färbung fand sowohl am Nikon Inversionsmikroskop, sowie am Leica KLSM statt.

### **2.2.19 Inhibitor- und Hormonbehandlungen**

Um die Beteiligung verschiedener Signalwege an der Entstehung der Urkeimzellen zu untersuchen wurde die Entwicklung von *Platynereis* zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils mit spezifischen Inhibitoren und Hormone beeinflusst. Dazu wurden die Embryonen zunächst von der Eigallerte befreit, indem sie mit KSW über einem feinen Sieb gewaschen wurden. Dann wurden die Embryonen zurück in ein Glasschälchen überführt, und am Boden der Schüssel einrotiert. In einer 6-Well-Plate wurden unterdessen 4 ml KSW und die jeweilige Chemikalie vermischt und anschließend mit 1 ml KSW mit Embryonen zu 5 ml aufgefüllt. Der Zeitraum der Inkubation richtete sich

dabei nach dem Ziel der einzelnen Untersuchung. Sollte die Entstehung der Zelle 4d untersucht werden, erfolgte die Inkubation von 4 h bis 5 h. War die Entstehung der Urkeimzellen Ziel des Versuches, so lag der Zeitraum bei 6 h bis 8 h. Nach der jeweiligen Zeitspanne wurden die Tiere sorgfältig mit KSW gewaschen und bis zu einem Alter von 6 T in KSW belassen, in dem sie schließlich wie in 2.2.15 beschrieben fixiert und gefärbt wurden.

#### **2.2.20 Auswertung von Inhibitor-/Hormonbehandlungen**

Nachdem die mit Inhibitoren und Hormonen behandelten Tiere wie in 2.2.15 behandelt wurden, wurden von jedem Ansatz 100 Tiere hinsichtlich ihrer Urkeimzellen Anzahl am Nikon Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Urkeimzellen Anzahl von jedem Tier wurde notiert und mit Hilfe von Excel statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt.

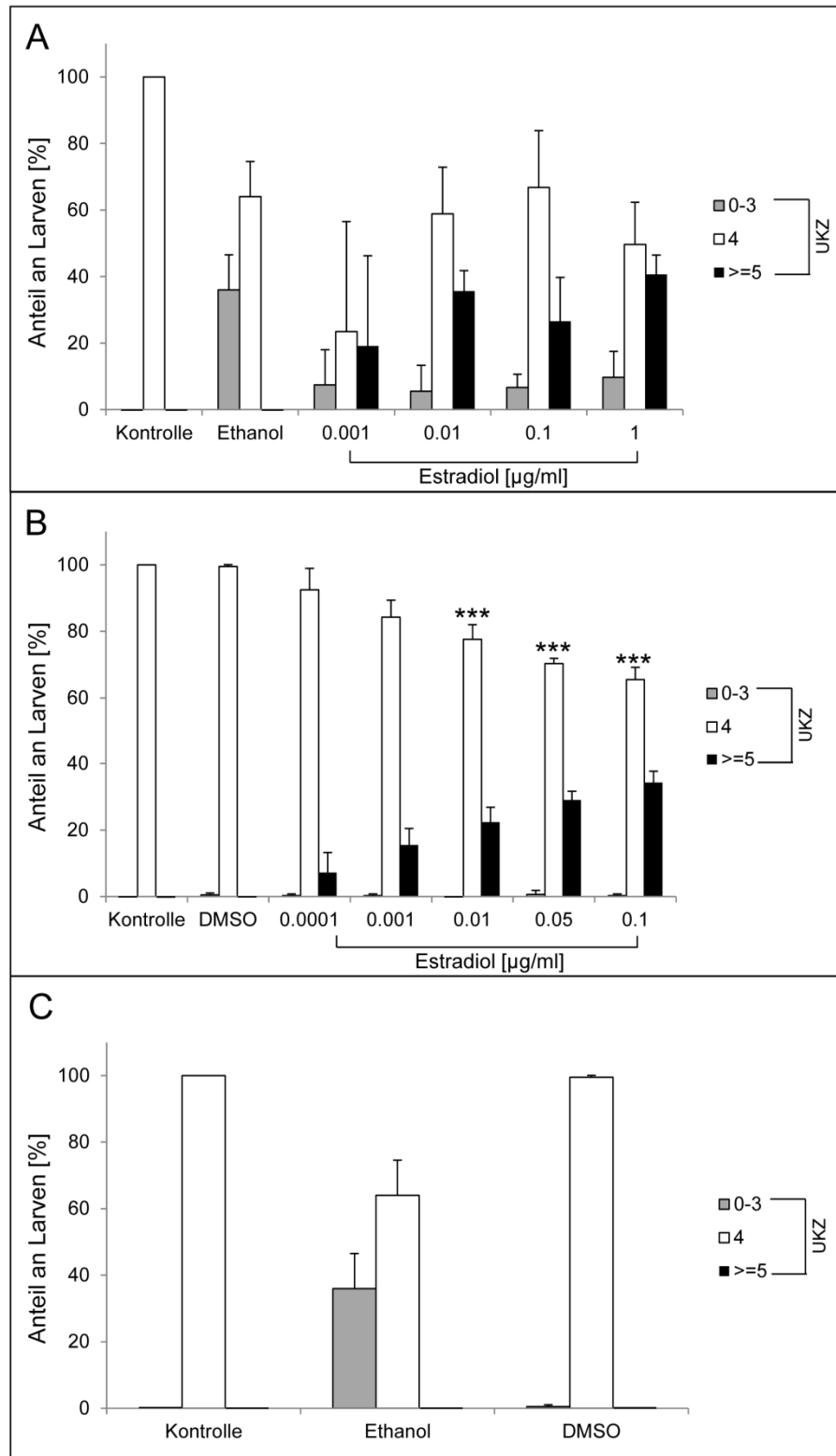
### **3 Ergebnisse**

### **3.1 Das Steroidhormon 17- $\beta$ -Estradiol erhöht die Anzahl der Urkeimzellen in *Platynereis*.**

Nachdem 2003 gezeigt wurde, dass *Platynereis dumerilii* einen durch Estradiol aktivierbaren Estradiolrezeptor besitzt (Thornton et al., 2003), konnte Javier Garcia-Alonso 2005 in seiner Promotion zeigen, dass durch Estradiol die Vitellogeninsynthese in *Platynereis* beeinflusst wird. Über weitere Auswirkungen von Estradiol auf die Entwicklung von *Platynereis* hat es bisher jedoch keine Untersuchungen gegeben. Da Estradiol Auswirkungen auf die Urkeimzellen Entwicklung in der Maus hat (La Sala et al., 2010), sollte untersucht werden, ob ein ähnlicher Effekt in *Platynereis* erzeugt werden kann. In ersten Ansätzen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Estradiol ab 24 h keine Auswirkungen auf die Anzahl der Urkeimzellen in *Platynereis* hat (Garcia-Alonso et al., 2011). Es kam die Frage auf, ob eine Behandlung mit Estradiol zu einem früheren Zeitpunkt einen Einfluss auf die Entstehung der Urkeimzellen nehmen kann.

#### **3.1.1 Ermittlung eines geeigneten Lösungsmittels und einer geeigneten Konzentration von Estradiol für weitere Versuche.**

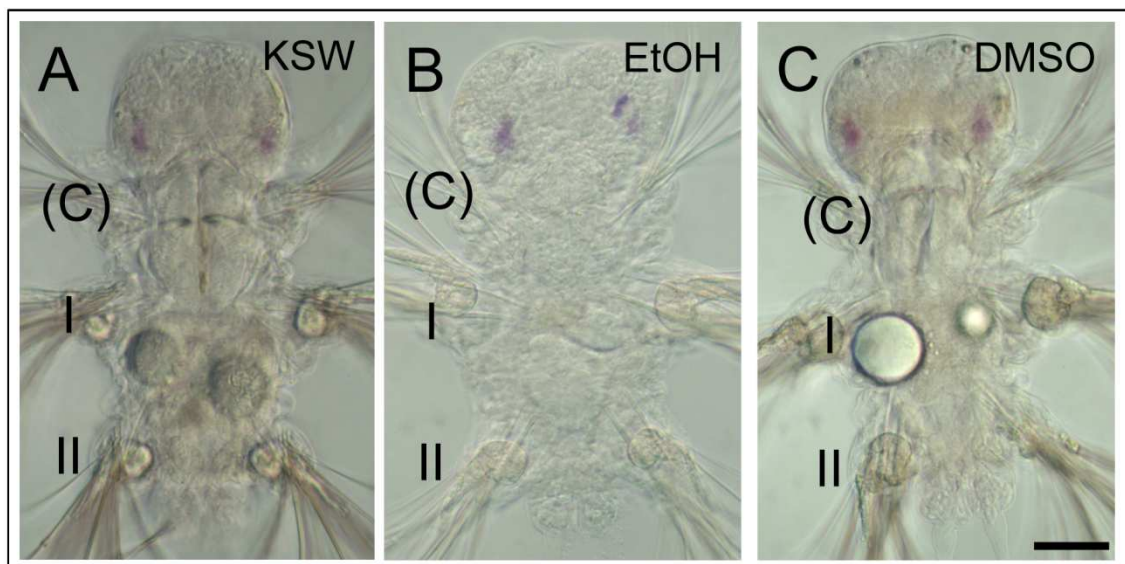
Zuerst wurde eine geeignete Konzentration gesucht, um die Auswirkungen von Estradiol auf die Urkeimzellentwicklung zu untersuchen. Ausgehend von den Konzentrationen, mit denen bereits Experimente zur Auswirkung von Estradiol auf die Urkeimzellentwicklung nach 24 h durchgeführt wurden (Garcia-Alonso et al., 2011), wurden zunächst die Konzentrationen 0,0001  $\mu\text{g/ml}$ , 0,001  $\mu\text{g/ml}$ , 0,01  $\mu\text{g/ml}$  und 0,1  $\mu\text{g/ml}$  verwendet. Als Lösungsmittel für das Steroid wurde zunächst, wie bei Garcia-Alonso angegeben, Ethanol eingesetzt. Der Behandlungszeitraum lag zwischen 2 h und 24 h. Nach 6 Tagen wurden die Larven fixiert, da ab diesem Zeitpunkt die Anzahl der Urkeimzellen mit Hilfe einer immunohistochemischen Färbung des Vasa Proteins gut bestimmt werden kann.



**Abbildung 15: Die Behandlung mit Estradiol führt zu überzähligen Urkeimzellen, Ethanol ist dabei als Lösungsmittel ungeeignet.** (A) Die Behandlung mit Estradiol zeigt eine konzentrationsabhängige Wirkung von Estradiol auf die Urkeimzellen Anzahl. Das Lösungsmittel Ethanol erzeugt jedoch eine Reduktion der Anzahl der Urkeimzellen. (B) Der dosisabhängige Effekt von Estradiol tritt auch bei der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel auf, welches im Gegensatz zu Ethanol keine Auswirkung auf die Anzahl der Urkeimzellen hat (C). Für jede Konzentration wurden je 100 Larven aus mindestens 3 unabhängigen Versuchsansätzen ausgewertet.



Die so mit Estradiol behandelten Larven wiesen im Vergleich mit unbehandelten Larven eine höhere Anzahl an Urkeimzellen auf (Abbildung 15 A). Allerdings hatte eine Kontroll-Behandlung nur mit Ethanol zur Folge, dass sich Larven mit weniger als vier Urkeimzellen entwickelten, was auch bei den mit Estradiol inkubierten Tieren auftrat. Der Versuch wurde erneut durchgeführt, jedoch mit DMSO als Lösungsmittel. Die mit Estradiol inkubierten Larven wiesen auch in diesem Fall eine höhere Anzahl an Urkeimzellen auf (Abbildung 15 B), das DMSO alleine zeigte aber keine Auswirkung auf die Urkeimzellen Anzahl. Der direkte Vergleich zwischen den beiden Lösungsmitteln zeigt, dass DMSO das geeignetere Lösungsmittel für diese Versuche darstellte, da es keine Veränderung in der Urkeimzellen Anzahl erzeugte (Abbildung 15 C). Beide getesteten Lösungsmittel zeigten keinen Einfluss auf die morphologische Entwicklung der Larven (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Die Lösungsmittel Ethanol und DMSO bewirken keine morphologischen Veränderungen in der Entwicklung der Larven.** Markierung der Segmente: Cephalisierendes Segment (C), erstes Segment (I), zweites Segment (II). Das anteriore Ende der Tiere ist oben, das posteriore unten. Der Maßstab entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

Ethanol ist kein geeignetes Lösungsmittel für diesen Versuch, da es die Anzahl der Urkeimzellen verringert. Für alle weiteren Versuche wurde deswegen DMSO verwendet.

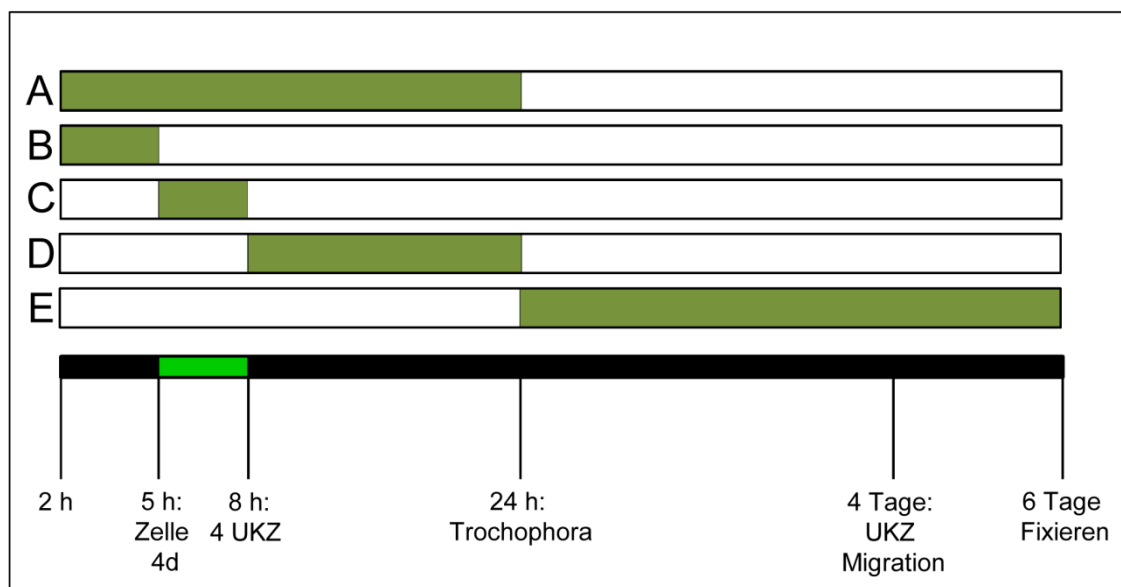
Ein Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationen an Estradiol zeigte, dass die Anzahl an Larven mit einer höheren Urkeimzellen Anzahl mit steigender Konzentration zunahm. Die geringste getestete Konzentration 0,0001 mg/l erzeugte 7,25  $\pm$  6 % Larven mit mehr als vier Urkeimzellen, bei 0,001 mg/l waren es 15,5  $\pm$  5 %. Ab der Konzentration von 0,01 mg/l mit 22,4  $\pm$  4,4 % Larven mit überzähligen Urkeimzellen

liegt eine höchst signifikante Differenz zu den Kontroll Larven vor. Diese wurde anhand eines Kruskal Wallis Test ermittelt (siehe 6.2). Die höchste getestete Konzentration von 0,1 mg/l erzeugte 34,25 +/- 3,4 % Larven mit mehr als vier Urkeimzellen (Abbildung 15 B). Alle Konzentrationen wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen getestet. In keinem Ansatz konnte eine Veränderung der Morphologie der Larven festgestellt werden. Bei einer ersten Behandlung wurde ebenfalls eine Konzentration von 1 mg/l verwendet. Da die so behandelten Larven jedoch teilweise Deformationen aufwiesen wurde diese Konzentration für die weiteren Versuche nicht verwendet.

Die Konzentration von 0,1 mg/l erzeugte den höchsten Anteil Larven mit überzähligen Urkeimzellen, ohne morphologische Veränderungen bei den Larven zu erzeugen. Sie wurde für alle weiteren Versuche verwendet.

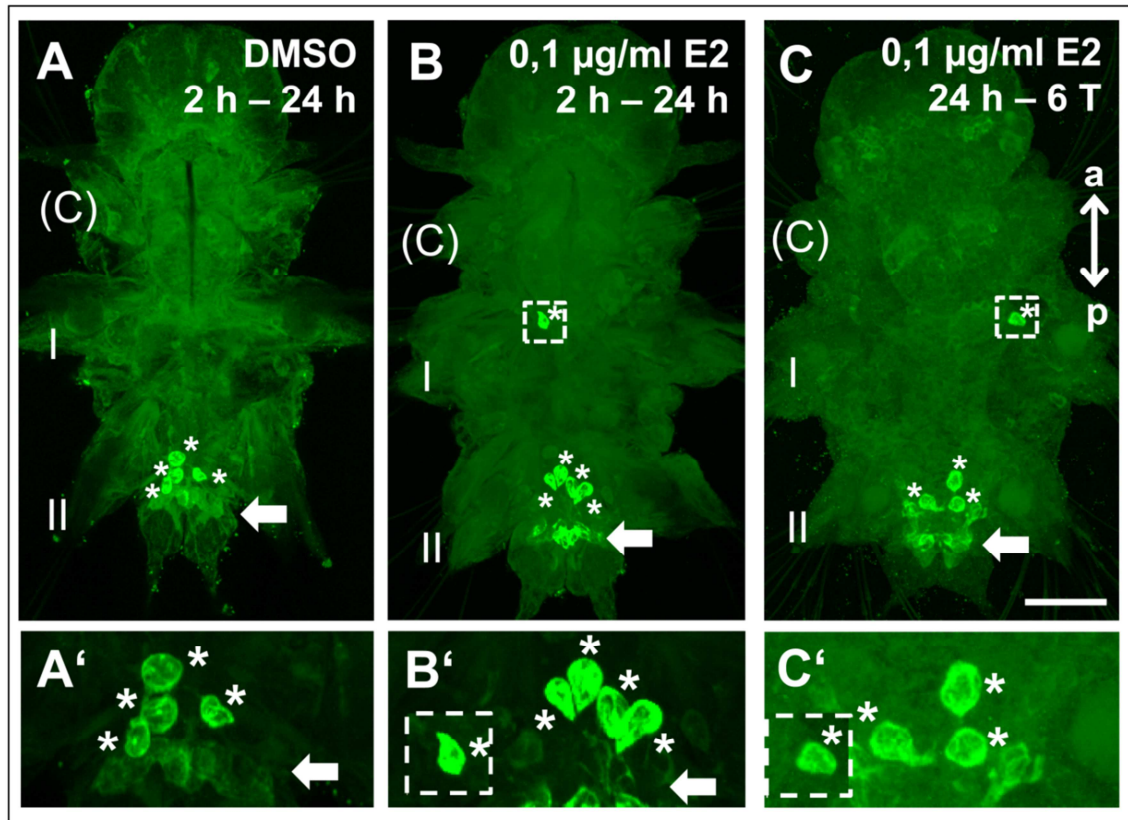
### 3.1.2 Eine Behandlung mit Estradiol führt nur in einem begrenzten Zeitfenster zu überzähligen Urkeimzellen.

Nachdem eine geeignete Konzentration für alle weiteren Versuche gefunden war, rückte die Frage nach dem Zeitraum, in dem Estradiol die Anzahl der Urkeimzellen erhöhen kann in den Mittelpunkt.



**Abbildung 17: Zeiträume der Estradiol und Ethinylestradiol Behandlung in Relation zu wichtigen Schritten in der Entwicklung von *P. dumerilii*.** Behandlung A: 2 – 24 h E2 (grüne Balken). Die Behandlung schließt die Bildung der Zelle 4d (5 h), die Entstehung der Urkeimzellen (6 – 8 h), und die Entstehung der Wachstumszone (24 h), ein. Behandlung B: 2 – 5 h E2. Die Behandlung liegt vor der Entstehung der Urkeimzellen, erfasst aber die Bildung der Zelle 4d. Behandlung C: 5 – 8 h E2. Die Entstehung der Urkeimzellen liegt in diesem Behandlungszeitraum. Behandlung D: 8 – 24 h E2. Die Urkeimzellen bilden sich vor dieser Behandlung, die Entstehung der Wachstumszone wird abgedeckt. Behandlung E: 24 h – 6 Tage E2. Diese Behandlung findet während der larvalen Entwicklung statt.

Zunächst wurden zwei Zeiträume untersucht, 2 h bis 24 h und 24 h bis 6 Tage (Abbildung 17 A, E). Anders als bei der Inkubation von 24 h bis 6 Tage erzeugte die frühe Behandlung mit Estradiol von 2 h bis 24 h überzähligen Urkeimzellen (Abbildung 18).

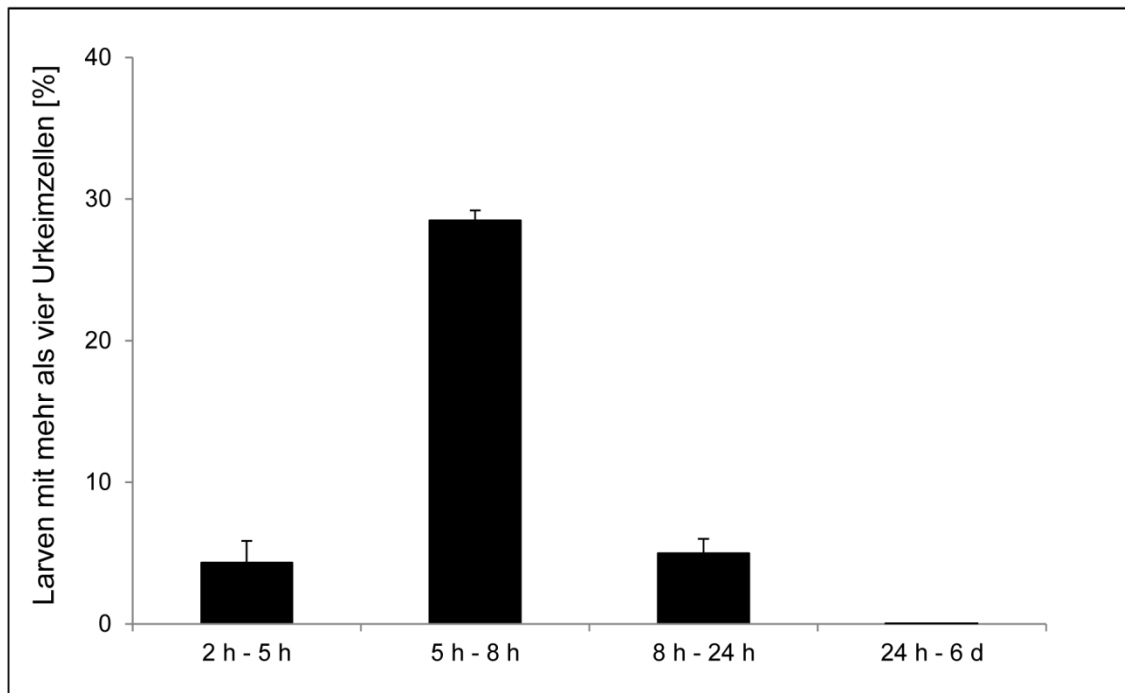


**Abbildung 18: Die Inkubation mit Estradiol von 2 h bis 24 h führt zu überzähligen Urkeimzellen.** (A) Larven, die als Negativkontrolle mit 0,1 % DMSO von 2 bis 24 h inkubiert wurden entwickeln vier Urkeimzellen. (B) Eine Inkubation mit Estradiol von 2 bis 24 h führt zu überzähligen Urkeimzellen. (C) Eine Behandlung nach 24 h bis 6 Tage hat keine Auswirkung auf die Urkeimzellen Anzahl; wie in der Kontrolle finden sich hier vier Zellen. (A', B', C') zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der Urkeimzellen aus A, B, und C. Grün: Vasa Expression. Die Urkeimzellen sind mit Sternen markiert, die Wachstumszone mit einem Pfeil. Markierung der Segmente: Cephalisierendes Segment (C), erstes Segment (I), zweites Segment (II). Das anteriore Ende der Tiere ist oben, das posteriore unten. Der Maßstab entspricht in (A, B, C) 50 µm, in (A', B', C') 20 µm.

Der Zeitraum, in dem eine Behandlung mit Estradiol zu überzähligen Urkeimzellen führt liegt zwischen 2 h und 24 h.

Als nächstes wurde der Behandlungszeitraum für eine weitere Eingrenzung in drei Abschnitte unterteilt. Der erste lag mit 2 h bis 5 h vor der Entstehung der Urkeimzellen, der zweite umfasste die Entstehung der Urkeimzellen (5 h bis 8 h), der dritte deckte die

Zeit nach der Entstehung der Urkeimzellen von 8 h bis 24 h ab (Abbildung 17 B, C, D).



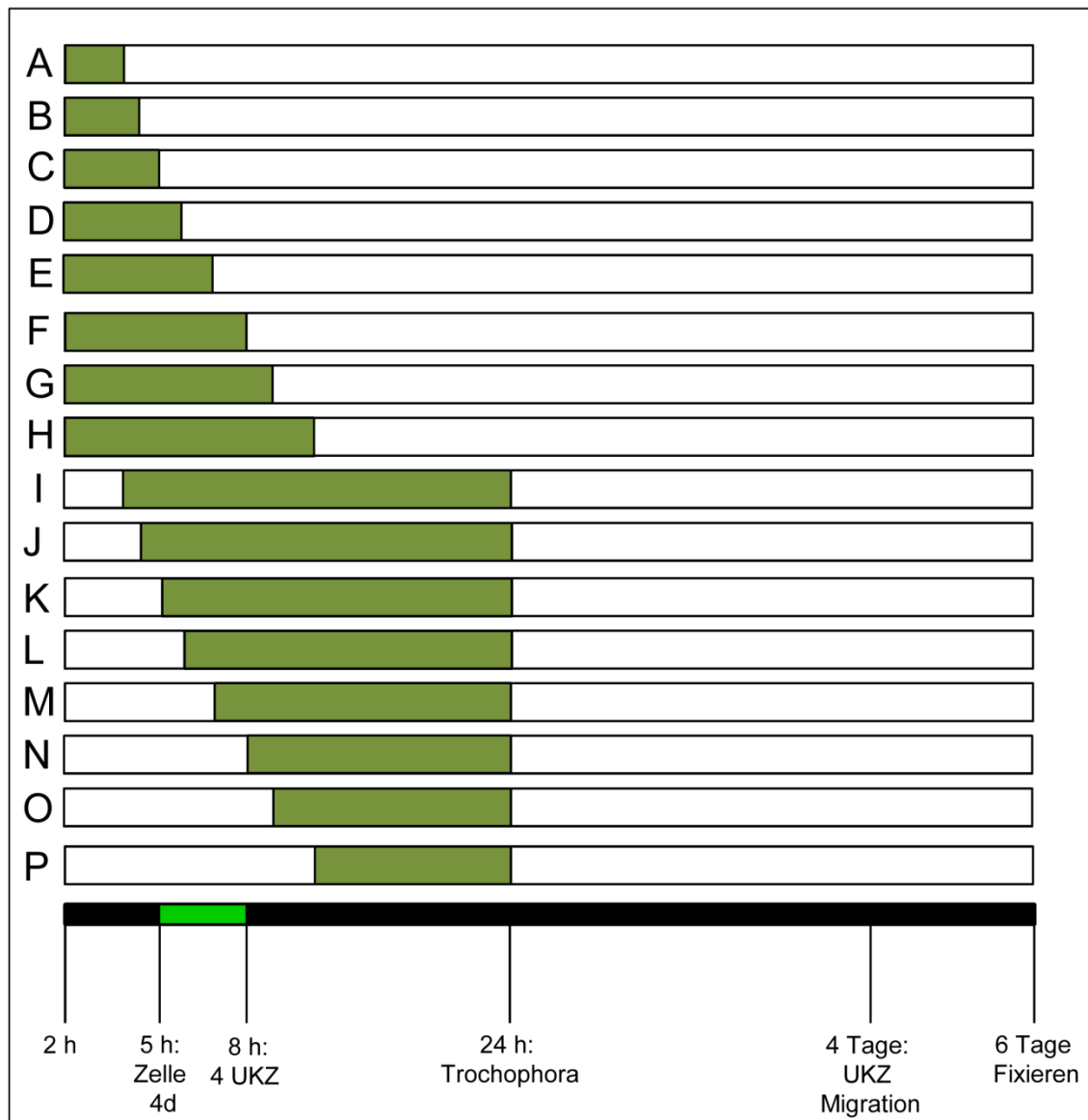
**Abbildung 19: Während der Entstehung der Urkeimzellen liegt ein sensibler Zeitraum für die Behandlung mit Estradiol.** Eine Inkubation mit E2 während der Entstehung der Urkeimzellen (5 – 8 h) führt zu einem wesentlich deutlicheren Effekt als die Inkubationen kurz vorher (2 – 5 h) oder nachher (8 – 24 h). Eine Behandlung der Embryonen von 24 h – 6 T zeigt keine Auswirkung auf die Urkeimzellen Anzahl.

In allen drei Zeiträumen entstanden Larven mit überzähligen Urkeimzellen. In Zeitraum A und Zeitraum C jedoch jeweils nur  $4,3 \pm 1,5 \%$  und  $5 \pm 1 \%$ . In Zeitraum B wiesen dagegen  $28,5 \pm 0,7 \%$  der Larven mehr als vier Urkeimzellen auf (Abbildung 19), was dem Ergebnis einer Inkubation über den gesamten Zeitraum von 2 h bis 24 h mit  $34,25 \pm 3,4 \%$  (siehe Abbildung 15 B) nahe kam.

Während der Entstehung der Urkeimzellen (5 – 8 h) führt eine Behandlung mit Estradiol zu überzähligen Urkeimzellen. Der für Estradiol sensible Zeitraum erstreckt sich jedoch über einen längeren Zeitraum.

Um den Zeitraum für eine Behandlung mit Estradiol weiter einzugrenzen wurden verschiedene Inkubationen durchgeführt, welche sich grob in zwei Gruppen einteilen ließen. Die erste Gruppe wurde von 2 h an mit Estradiol behandelt. Beginnend bei der Dauer von einer Stunde (2 h bis 3 h) wurden die Intervalle je Behandlung um eine Stunde verlängert, bis die letzte Behandlung bis 10 h reichte (Abbildung 20 1-8). In der zweiten Gruppe wurden die Embryonen immer bis zu einem Alter von 24 h inkubiert.

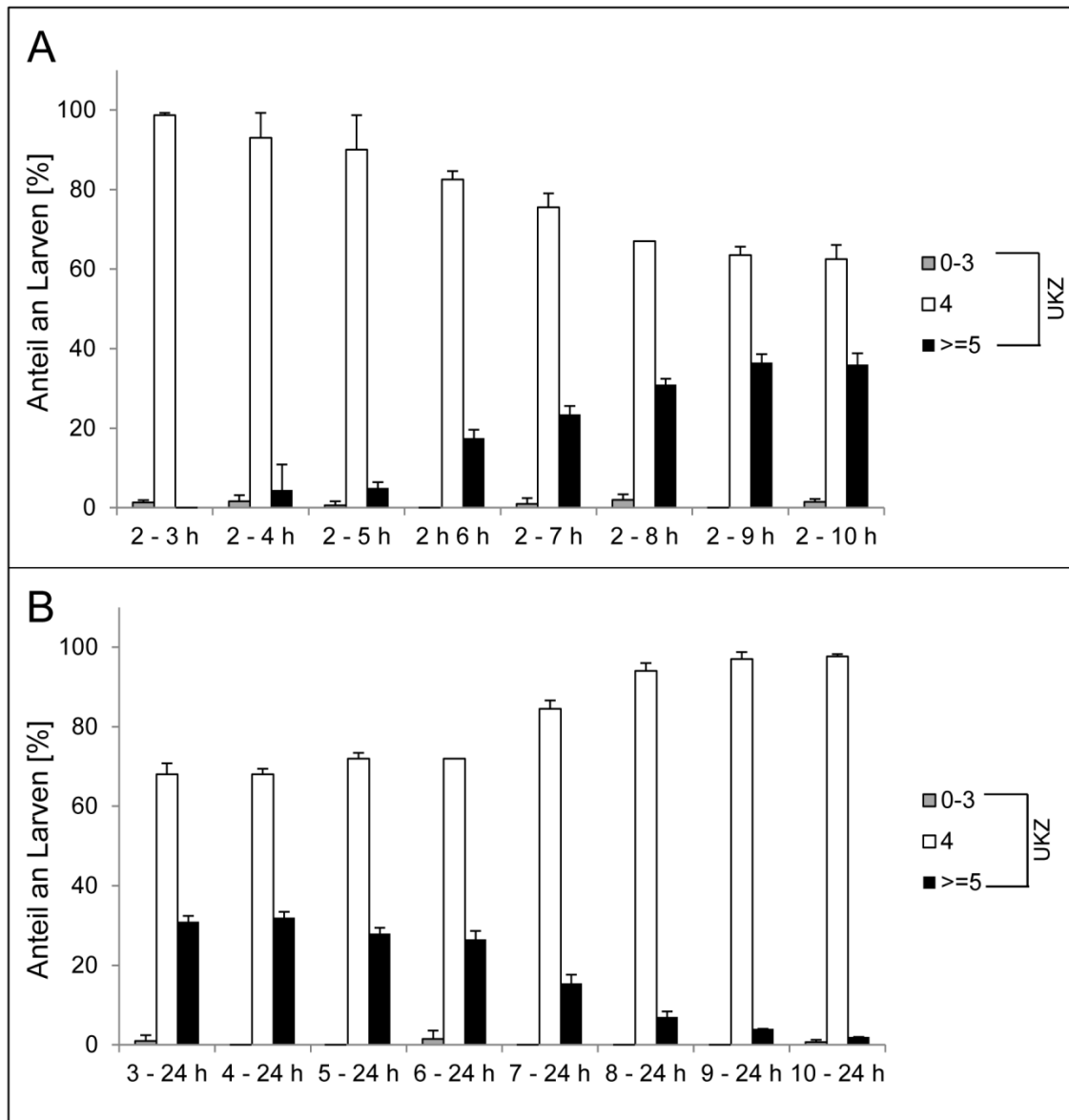
Die erste Behandlung begann bei 3 h, jede weitere Behandlung begann eine Stunde später, die kürzeste Behandlung begann bei 10 h (Abbildung 20 9-16).



**Abbildung 20: Behandlungsschema für die Eingrenzung des sensitiven Zeitraums.** Die weitere Eingrenzung des Zeitraums in dem die Embryonen sensitiv auf eine Behandlung mit E2 reagieren, erfolgt mit Schrittweise verlängerten, oder verkürzten Inkubationen (grüne Balken). Beginnend bei Behandlung 1 mit einem Intervall von 2 – 3 h, verlängern sich die Inkubationen bis zu Behandlung 8 um jeweils eine Stunde bis zu einer Inkubation von 2 – 10 (Nr. 8). Behandlung 9 bis 16 verkürzen sich jeweils um eine Stunde. Die erste (Nr. 9) erstreckt sich über einen Zeitraum von 3 – 24 h, die letzte (Nr. 16) über einen Zeitraum von 10 – 24 h.

Die Behandlung von 2 h bis 3 h zeigte keine Auswirkungen auf die Urkeimzellen Anzahl. Ab einer Behandlung von 2 h bis 4 h waren Larven mit mehr als vier Urkeimzellen zu finden. In diesem Zeitraum hatten 4,5 +/- 6,3 % Larven überzählige Urkeimzellen, je länger die Behandlung dauerte, desto mehr stieg der Anteil. Eine Behandlung bis 5 h erzeugte 5 +/- 1,4 %, eine bis 6 h 17,5 +/- 2,1 % Larven mit mehr

als vier Urkeimzellen. Nach einer Inkubation bis 7 h konnten 23,5  $\pm$  2,1 % Larven mit erhöhter Urkeimzellen Anzahl gefunden werden, nach einer Behandlung bis 8 h waren es 31  $\pm$  1,4 %. Ab einer Inkubation bis 9 h blieb die Anzahl an Larven mit überzähligen Urkeimzellen mit 36,5  $\pm$  2,1 % konstant, bei der Inkubation bis 10 h betrug sie 36  $\pm$  3,5 % (Abbildung 21 A). Die Behandlung von 3 h bis 24 h erzeugte 31  $\pm$  1,4 %, eine Inkubation mit Estradiol 4 h bis 24 h erzeugte 32  $\pm$  1,4 % Larven mit mehr als vier Urkeimzellen. Die Verkürzung der Behandlungen resultierte in weniger Larven mit überzähligen Urkeimzellen. Ab 5 h waren es 28  $\pm$  1,4 %, ab 6 h 26,5  $\pm$  2,1 %. 15,5  $\pm$  2,1 % der Larven hatten überzählige Urkeimzellen bei einer Behandlung von 7 h, von 8 h waren es nur noch 7  $\pm$  1,4 %. Die Inkubation von 9 h an erzeugte nur noch 4  $\pm$  0 %, und die Inkubation ab 10 h 2  $\pm$  0 % Larven mit mehr als vier Urkeimzellen (Abbildung 21 B). Vor 4 h und nach 9 h zeigte die Inkubation mit Estradiol keine Effekte auf die Anzahl der Urkeimzellen.



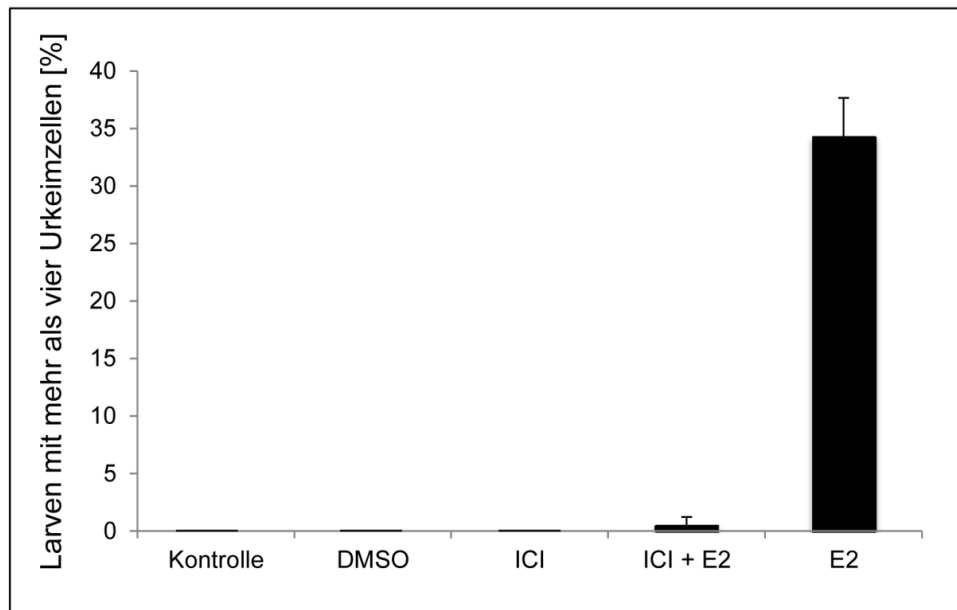
**Abbildung 21: Der sensitive Zeitraum für eine Estradiol Behandlung lässt sich auf 4 h bis 9 h eingrenzen.** (A) Die Anzahl an Larven mit überzähligen Urkeimzellen steigt mit längeren Inkubationszeiträumen bis 9 h an. (B) Ab 4 h sinkt die Anzahl an Larven mit mehr als vier Urkeimzellen.

Der sensible Zeitraum für eine Behandlung mit Estradiol lässt sich auf 4 h bis 9 h eingrenzen.

### 3.1.3 Der durch Estradiol hervorgerufene Effekt wird durch den Estradiolrezeptor vermittelt.

Da Estradiol eine Auswirkung auf die Entwicklung der Urkeimzellen zeigte, kam nun die Frage auf, über welchen Rezeptor der Effekt entstand. Estradiol bindet an verschiedene Rezeptoren, wie die Estradiolrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  (Dahlman-Wright et al.,

2006; Heldring et al., 2007) oder den G Protein gekoppelten Rezeptor GPR30 (Maggiolini and Picard, 2010). Es galt also zu klären, ob das Estradiol in diesem Fall an den Estradiolrezeptor selber oder an einen anderen Rezeptor bindet. Dazu wurde der ER spezifische Inhibitor ICI182,780 (ICI) verwendet. Das ICI wurde in einer Konzentration von 6 mg/l alleine und in Kombination mit 0,1 mg/l Estradiol von 2 h bis 24 h appliziert. Nach 6 Tagen wurden die Larven fixiert und aus drei unabhängigen Ansätzen jeweils 100 Tiere pro Ansatz ausgewertet.



**Abbildung 22: Die Auswirkungen von Estradiol auf die Urkeimzellen Entwicklung lassen sich durch den ER Inhibitor ICI hemmen.** Durch den Einsatz des Estradiolrezeptor Inhibitors ICI lässt sich zeigen, dass der durch die Inkubation mit E2 erzielte Effekt durch die Beteiligung des Estradiolrezeptors zustande kommt. Eine zeitgleiche Inkubation von ICI und E2 zeigt keine Auswirkungen auf die Urkeimzellen Anzahl. Eine Inkubation nur mit ICI führt ebenfalls zu keinem Effekt auf die Urkeimzellen.

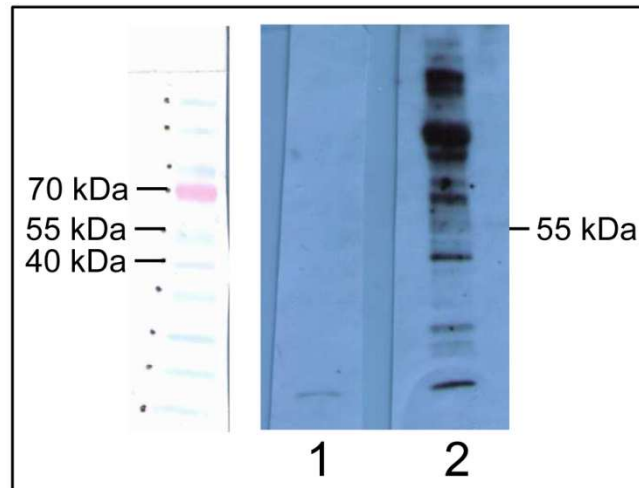
Es zeigte sich, dass nach einer gleichzeitigen Inkubation von ICI mit Estradiol die Larven die normale Anzahl von vier Urkeimzellen aufwiesen (Abbildung 22). Der Estradiol-Effekt ließ sich also durch den Estradiolrezeptor Inhibitor blockieren. Eine Inkubation mit dem Inhibitor alleine zeigte keinerlei Auswirkungen auf die Anzahl der Urkeimzellen. Um auszuschließen, dass die eingesetzte Konzentration von 6 mg/l nicht zu gering für einen Effekt war, wurden höhere Konzentrationen von 10 mg/l, 25 mg/l und 50 mg/l getestet. Die Larven zeigten jeweils eine normale Morphologie und auch die normale Anzahl an Urkeimzellen.

Der spezielle Estradiolrezeptor-Inhibitor ICI blockiert den durch Estradiol induzierten Effekt. Der Estradiolrezeptor ist also an der Erhöhung der Urkeimzellen Anzahl beteiligt.

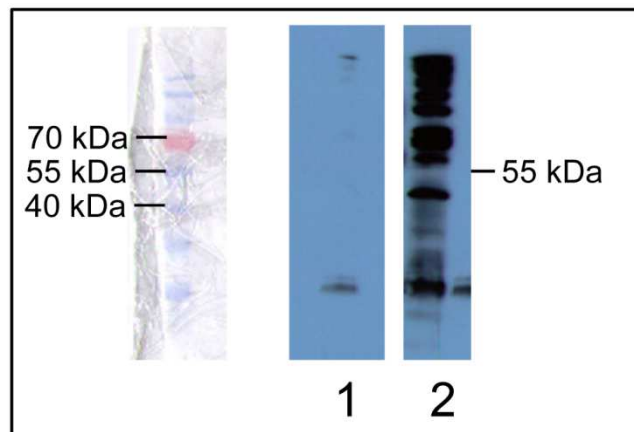


### 3.1.4 Der Nachweis des Estradiolrezeptors mittels Western Blot war erfolglos.

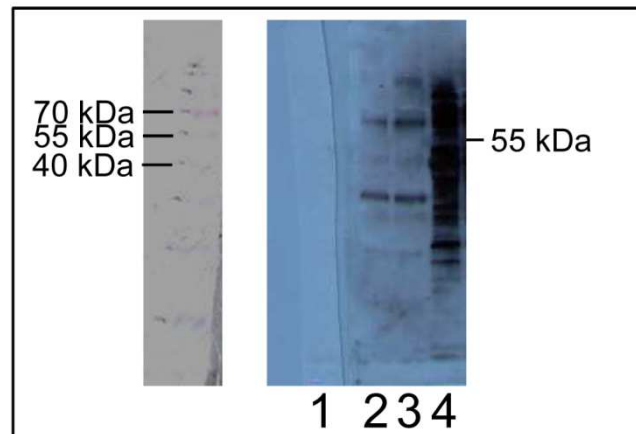
Für den Nachweis des Estradiolrezeptors in Embryonen und Larven standen drei verschiedene Antikörper zur Verfügung. Um zu ermitteln, welcher von ihnen zur Detektion des Pdu-Estradiolrezeptors geeignet war, wurden alle drei im Western Blot getestet. Der Proteinextrakt für die Westernblots wurde aus 7 h alten Embryonen gewonnen.



**Abbildung 23: Mit dem ER Antikörper von St. Cruz lässt sich keine spezifische Bande detektieren.** Der Zweitantikörper alleine erzeugt bei gleicher Belichtung nur eine sehr niedrige Bande (1), während der  $\alpha$ -ER Antikörper viele Banden produziert, jedoch keine bei der erwarteten Größe von 55 kDa.



**Abbildung 24: Bei dem ER Antikörper von Sigma lässt sich keine Bande der erwarteten Größe detektieren.** (1) Der Zweitantikörper erzeugt alleine und bei gleicher Belichtung keinen Hintergrund. (2) Der Antikörper von Sigma erzeugt keine Bande der errechneten Größe von 55 kDa.



**Abbildung 25: Der ER Antikörper von Novatain detektiert keine Bande der erwarteten Größe.** (1) Der Zweitantikörper erzeugt alleine bei gleicher Belichtung keine Banden. (2) In Zelllysaten von Zellen ohne ER lässt sich keine 55 kDa Bande detektieren, jedoch genau so wenig im Zelllysate der mit *PduER* transfizierten Zellen (3). (4) Ebenfalls keine Bande der erwarteten Größe 55 kDa lässt sich in *Platynereis* Proteinextrakt detektieren.

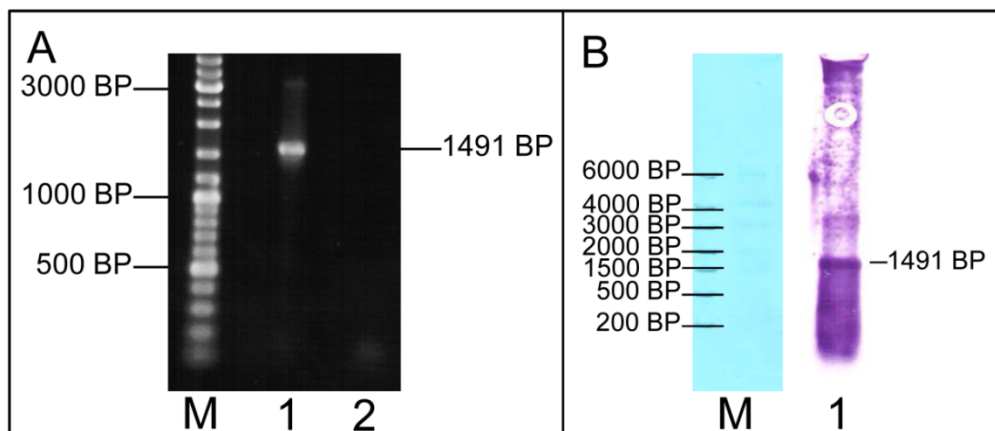
Der Antikörper von St.Cruz erzeugte genau wie der Antikörper von Sigma keine spezifische Bande der errechneten Größe von 55 kDa, dafür aber viele unspezifische Banden unterschiedlicher Größen. Der Antikörper von Novatain wurde zusätzlich zu dem Proteinextrakt aus *Platynereis* Embryonen auch mit transfizierten Zellen verwendet. Die Zellen wurden freundlicher Weise von Dr. Christina Freitag mit dem ER-Plasmid transfiziert, und wie der Kontrollansatz, zu Zelllysaten verarbeitet. Jedoch konnte kein Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den transfizierten Zellen festgestellt werden. Genauso wenig konnte eine Bande von 55 kDa im *Platynereis* Proteinextrakt detektiert werden. Weitere Versuche mit anderen Konzentrationen der Antikörper oder Proteinextrakten aus Embryonen anderen Alters konnten aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

Mit den verwendeten Antikörpern und deren eingesetzten Konzentrationen war keine spezifische Bande nachweisbar.

### 3.1.5 Durch eine in Situ Hybridisierung (ISH) lässt sich *PduER* mRNA in 6 h alten Embryonen nachweisen.

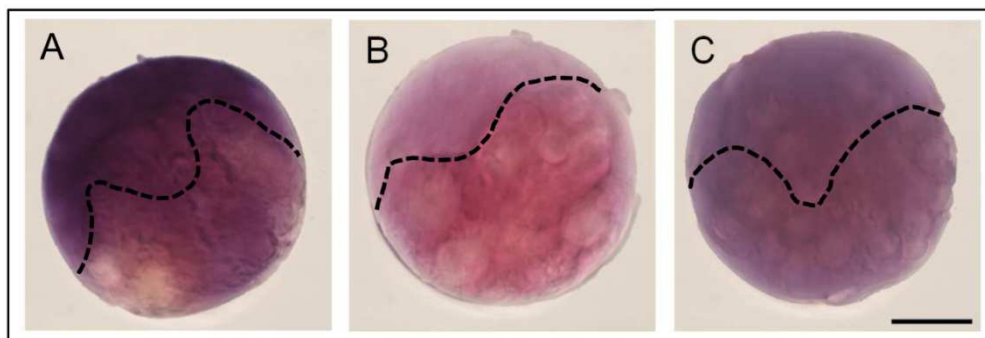
Neben der Detektion des Estradiolrezeptors auf Proteinebene, wurde auch das Vorkommen der mRNA untersucht. Dazu wurde sowohl eine mit Digoxigenin markierte Antisense als auch eine Sense Sonde des *PduER* hergestellt. Als Vorlage für die Sondensynthese wurde ein PCR Produkt der Größe 1419 BP, wobei es sich um die kodierende Sequenz des *PduER* handelte, verwendet (Abbildung 26 A). Die erfolgreiche Herstellung der Sonde wurde mit Hilfe eines Northern Blots nachgewiesen

(Abbildung 26 B). Es zeigte sich, dass erfolgreich eine Antisense Sonde in der gleichen Größe wie das PCR Produkt hergestellt wurde.



**Abbildung 26: Herstellung der Estradiolrezeptor Sonde.** (A) Als Vorlage für die Sondenherstellung diente ein PCR Produkt des Pdu-Estradiolrezeptors der Größe 1491 BP (1) Als Negativkontrolle wurde die PCR ohne Plasmid durchgeführt (2). (B) Die Sonde erzeugt im Northern Blot eine Bande mit der Größe 1491 BP.

Für die ISH wurden Embryonen im Alter von 6 h gewählt, da zu diesem Zeitpunkt mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte (Löwer, 2013). In der mit Antisense Sonde hybridisierten Probe konnte eine starke Färbung in den Mikromeren detektiert werden, während die mit Sense Sonde hybridisierten Larven nach der gleichen Inkubationsdauer mit der Färbelösung kein Signal zeigten (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Estradiolrezeptor mRNA lässt sich in einem 6 h alten Embryo in den Mikromeren nachweisen.** (A) In einem Alter von 6 Std lässt sich die mRNA des Estradiolrezeptors in den Mikromeren des Embryos nachweisen. (B) Die Probe mit der als Kontrolle verwendeten Sense Sonde wurde über den gleichen Zeitraum in der Färbelösung belassen. (C) Einige mit Sense Sonde behandelte Embryonen wiesen eine dunkle Färbung auf. Der Maßstab entspricht 20 µm.

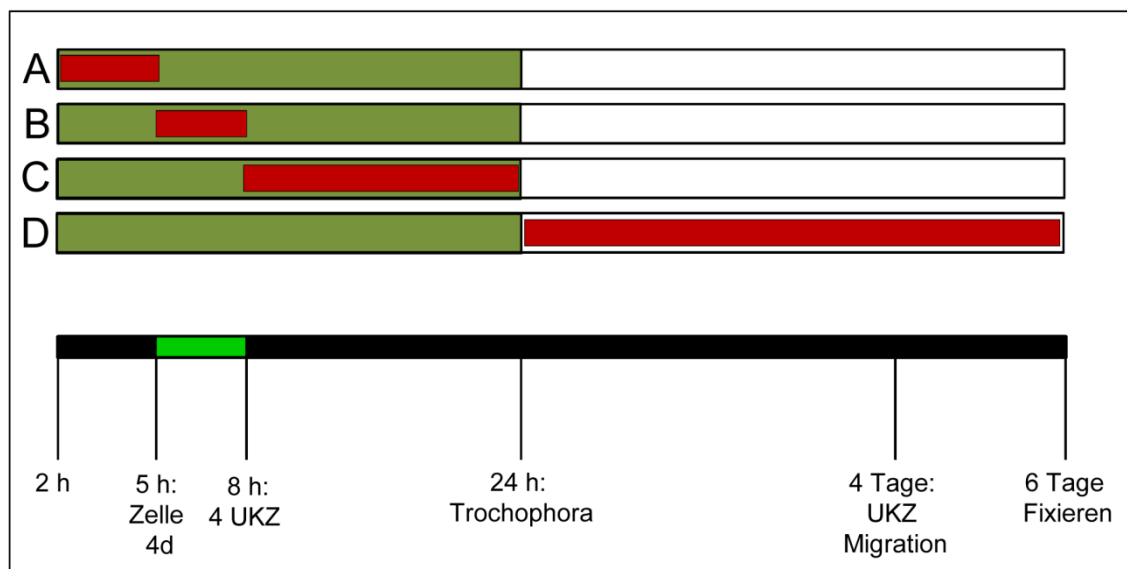
Die Färbung wurde jedoch zunächst für eine nicht spezifische Hintergrundfärbung gehalten, da auch einige Embryonen die nur mit Sense Sonde behandelt wurden eine dunkle Färbung aufwiesen (Abbildung 27 C). Daher wurden keine weiteren Hybridisierungen mit Embryonen anderen Alters durchgeführt. Ein Vergleich mit einer

*PduER*-ISH, die später von Dr. Stephanie Bannister durchgeführt wurde, bestätigte jedoch die Färbung der Antisense Sonde im Nachhinein. Aus Zeitmangel konnten keine weiteren Hybridisierungen mehr durchgeführt werden.

Im 6 h alten Embryo lässt sich die ER-mRNA in den Mikromeren nachweisen.

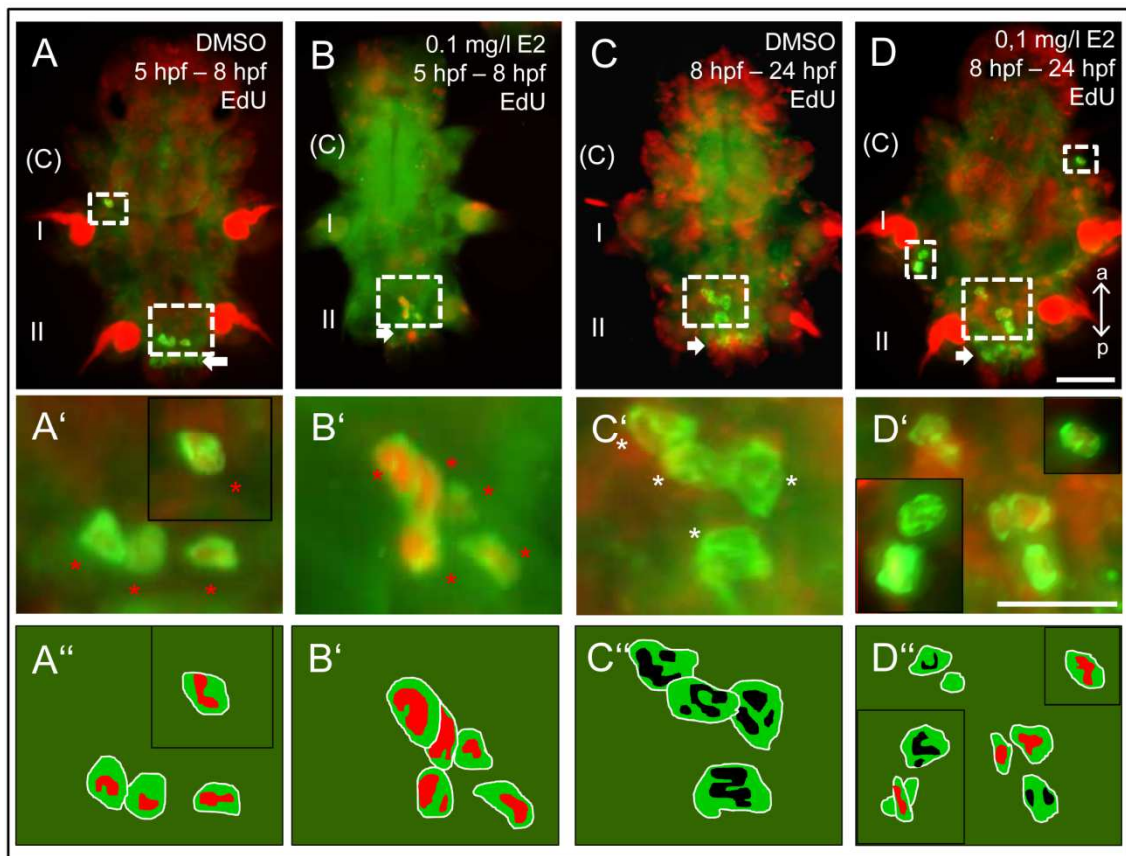
### 3.1.6 Nach einer Inkubation mit Estradiol entstehen Urkeimzellen später als gewöhnlich.

In den Abschnitten zuvor wurde gezeigt, dass sich bei *Platynereis dumerilii* nach einer Behandlung mit Estradiol während der Embryogenese überzählige Urkeimzellen bilden. Ohne eine Behandlung mit Estradiol bilden sich die Urkeimzellen zwischen 5 h und 8 h, und teilen sich nach 8 h nicht mehr, bis die Tiere etwa 20 Segmente lang sind. Um zu untersuchen, ob sich die Urkeimzellen nach einer Behandlung mit Estradiol auch noch nach 8 h teilen, wurde der Proliferationsmarker 5-Ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU) eingesetzt, welcher während einer Zellteilung als Thymidinanalogon in die DNA eingebaut wird. Auf diese Weise lassen sich Zellen nachweisen, die sich im Zeitraum der EdU-Inkubation geteilt haben. Ebenfalls lassen sich mindestens zwei Generationen an Tochterzellen von so markierten Zellen nachweisen, da diese die markierte DNA bei der Zellteilung erben. Die Embryonen wurden zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten mit EdU inkubiert.



**Abbildung 28: Inkubationszeiträume mit dem Proliferationsmarker EdU.** Zusätzlich zu der Behandlung mit E2 von 2 h bis 24 h (grüne Balken) erfolgt eine Inkubation mit EdU (rote Balken). Die erste Behandlung mit EdU erfolgt von 2 – 5 h (A), die zweite deckt die Entstehung der Urkeimzellen von 5 – 8 h ab (B). Die dritte Behandlung erfolgt nach der Bildung der Urkeimzellen von 8 – 24 h (C), und die vierte erfolgt nach der E2 Behandlung von 24 h – 6 Tage (D).

Der erste Ansatz wurde von 2 h bis 5 h inkubiert, bevor sich die Urkeimzellen bilden konnten. Der zweite Ansatz wurde während dem Zeitraum in dem sich die Urkeimzellen normalerweise bilden (5 h bis 8 h) mit dem EdU behandelt. Die dritte Behandlung mit EdU wurde von 8 h bis 24 h durchgeführt, wo sich normalerweise keine Urkeimzellen mehr bilden. Als vierter Behandlungszeitraum wurde 24 h bis 6 Tagen gewählt, um zu überprüfen ob während der Larvalentwicklung noch Zellteilungen der Urkeimzellen stattfinden (Abbildung 28). Alle vier Ansätze wurden mit Embryonen durchgeführt, die von 2 h bis 24 h mit Estradiol behandelt wurden, als Kontrolle dienten Tiere die im gleichen Zeitraum nur mit DMSO inkubiert wurden.

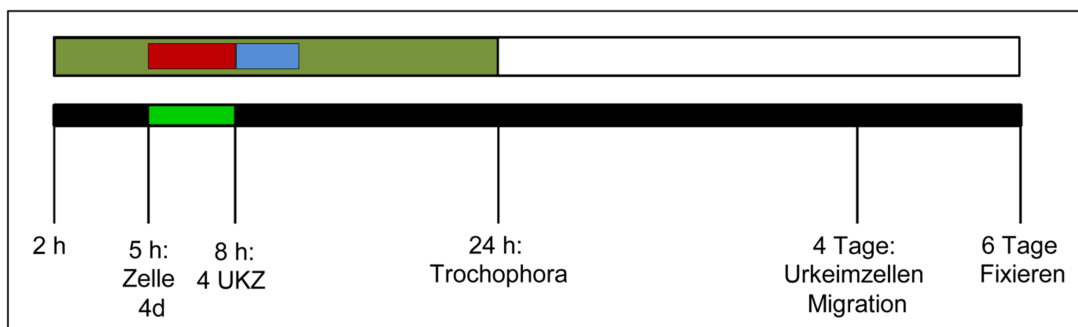


**Abbildung 29: Nach einer Behandlung mit E2 entstehen noch nach 8 Std Urkeimzellen.** (A) Eine Inkubation mit EdU während der Bildung der Urkeimzellen (5 – 8 Std) führt zu Larven mit vier markierten Urkeimzellen in den mit DMSO behandelten Kontrolltieren. (B) Die im gleichen Zeitraum mit EdU inkubierten Tiere, die zusätzlich von 2 – 24 Std mit E2 behandelt wurden, weisen ebenfalls eine Markierung aller Urkeimzellen auf (in diesem Fall fünf). (C) Eine Inkubation mit EdU nach der normalen Entstehungsphase der Urkeimzellen (8 – 24 Std) erzeugt in der DMSO Kontrolle keine EdU positiven Urkeimzellen, wohingegen in den mit E2 behandelten Tieren (D) markierte und unmarkierte Urkeimzellen zu finden sind. Eine größere Abbildung von D ist im Anhang zu finden (6.1) (A', B', C', D') zeigen einen Vergrößerten Ausschnitt der Urkeimzellen aus A, B, und C. Grün: Vasa Expression. Rot: EdU. Die Urkeimzellen sind mit Sternen markiert, die Wachstumszone mit einem Pfeil. Markierung der Segmente: Cephalisierendes Segment (C), erstes Segment (I), zweites Segment (II). Das anteriore Ende der Tiere ist oben, das posteriore unten. Der Maßstab entspricht in (A, B, C, D) 50 µm, in (A', B', C', D') 20 µm.

Nach einer Inkubation mit EdU von 5 h bis 8 h waren alle Urkeimzellen von beiden Proben EdU positiv. Dagegen waren in der 8 h bis 24 h Inkubation mit EdU alle Urkeimzellen in der Kontrolle EdU negativ. Die von 8 h bis 24 h mit EdU und Estradiol behandelten Larven die mehr als vier Urkeimzellen aufwiesen, hatten sowohl markierte als auch unmarkierte Urkeimzellen (Abbildung 29). Wurden die Larven nach 24 h mit EdU behandelt, waren alle Urkeimzellen in allen Proben EdU negativ (nicht abgebildet).

Nach einer Behandlung mit Estradiol entstehen nach 8 h im Gegensatz zu unbehandelten Embryonen noch Urkeimzellen.

Nachdem durch den Einsatz von EdU festgestellt werden konnte, dass sich das Zeitfenster der Urkeimzellentstehung durch eine Inkubation mit Estradiol verlängern lässt, blieb die Frage nach dem Ursprung der überzähligen Urkeimzellen offen. Die bisherigen Ergebnisse lassen sowohl die Möglichkeit, dass die Mesoblastzellen weitere Urkeimzellen abgeben, als auch die, dass sich die vier Urkeimzellen unter dem Einfluss des Estradiol unplanmäßig teilen. Um die Herkunft der überzähligen Urkeimzellen klären zu können wurde erneut EdU eingesetzt, dieses Mal jedoch in Kombination mit dem Proliferationsmarker Bromdesoxyuridin (BrdU), welcher ebenfalls statt Thymidin in die DNA eingebaut wird, aber über eine Antikörperfärbung nachgewiesen werden kann.



**Abbildung 30: Inkubation mit den Proliferationsmarkern EdU und BrdU.** Zusätzlich zu einer Behandlung von 2 h bis 24 h mit E2 (grüner Balken) erfolgte eine Inkubation von 5 h bis 8 h mit EdU (roter Balken) und anschließend von 8 bis 10 h mit BrdU (blauer Balken).

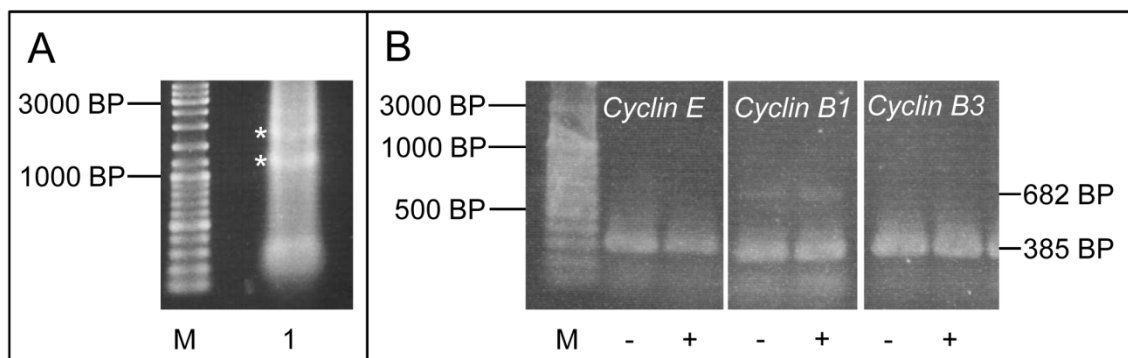
Zuerst erfolgte die Inkubation mit EdU von 5 h bis 8 h, und im Anschluss daran von 8 h bis 10 h mit BrdU (Abbildung 30), jeweils in Kombination mit Estradiol oder nur DMSO von 2 h bis 24 h. Über den Ursprung der Urkeimzellen ließ sich auf diesem Weg aber keine Aussage treffen, da sowohl die mit DMSO als auch die mit Estradiol behandelten

Tiere die Inkubation mit den zwei verschiedenen Proliferationsmarkern nicht überlebten. Eine Behandlung nur mit BrdU wirkte nicht letal auf die Embryonen.

Der Ursprung der überzähligen Urkeimzellen nach einer Behandlung mit Estradiol lässt sich mit einer doppelten Proliferationsmarker Behandlung nicht feststellen, da die Embryonen diese Behandlung nicht überleben.

### 3.1.7 Suche nach möglichen Zielgenen der Estradiol Behandlung.

Um mögliche Zielgene der Estradiol Behandlung von *Platynereis* zu ermitteln, wurde das Vorkommen der mRNA von drei Cyclinen mittels RT-PCR untersucht. Verglichen wurde dabei zwischen mit Estradiol behandelten und unbehandelten Embryonen. Dazu wurde RNA aus 7 h alten Embryonen präpariert, jeweils drei Gelege die nicht mit Estradiol behandelt wurden und 3 die ab 2 h mit 0,1 µg/ml Estradiol behandelt waren. Die RNA wurde nach der Präparation auf ein Agarosegel aufgetragen, um deren Qualität zu prüfen (Abbildung 31 A). Es zeigte sich, dass bei einer gelelektrophoretischen Auftrennung der präparierten RNA zwei ribosomale RNA Banden sichtbar wurden, was die gute Qualität der RNA zeigte.

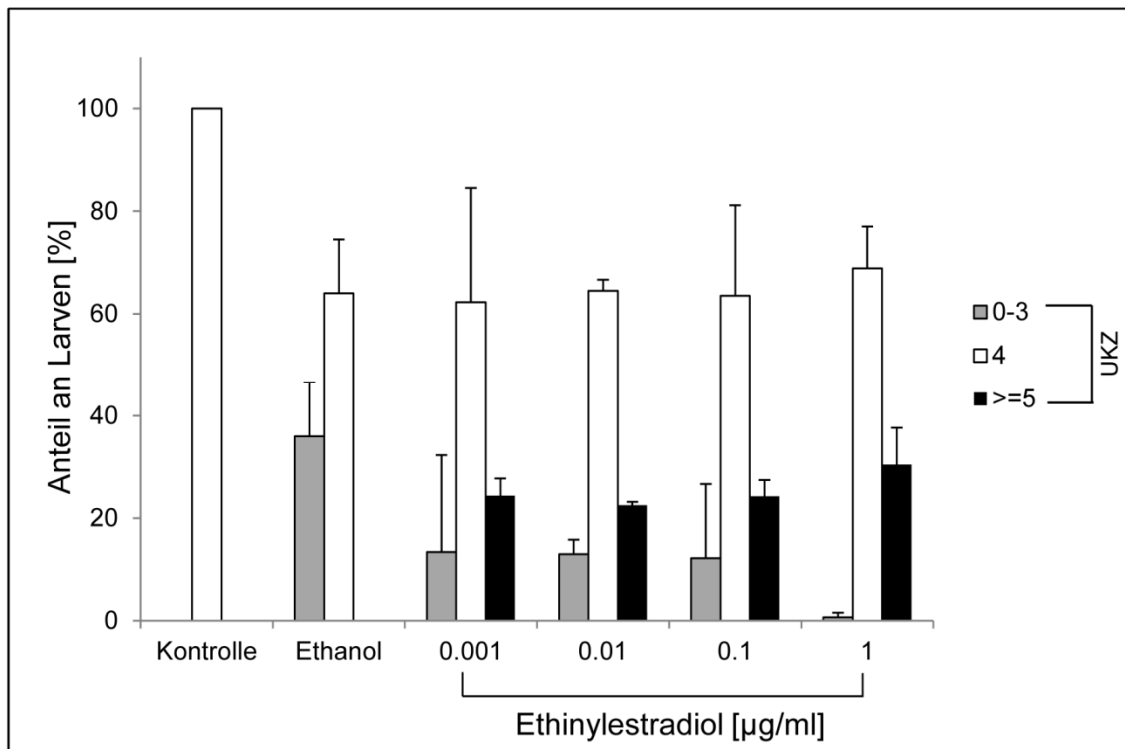


**Abbildung 31: Auf Transkript Ebene ließ sich kein Unterschied zwischen mit Estradiol behandelten und unbehandelten Embryonen aufzeigen.** (A) Exemplarische Abbildung einer RNA Präparation von Embryonen im Alter von 7 h. (B) Die Cycline E, B1 und B3 zeigten keine unterschiedliche Regulierung nach einer Behandlung mit Estradiol. Sowohl die PCR auf mit DMSO behandelten Embryonen als auch die auf mit E2 behandelten Embryonen wurde jeweils mit 3 unterschiedlichen Präparationen durchgeführt und ist jeweils exemplarisch abgebildet. 682 BP= *Cyclin B1*, 385 BP= *Aktin*, Sternchen= ribosomale RNA, M= Marker, -= mit DMSO behandelte Embryonen, += mit Estradiol behandelte Embryonen

Anschließend wurde aus der RNA cDNA hergestellt, welche dann als Template in PCR Reaktionen eingesetzt wurde. Untersucht wurden die Transkriptmengen von *PduCyclinB1*, *PduCyclinB3* und *PduCyclinE*. Es ließ sich jedoch bei keinem der getesteten Transkripte eine Änderung zwischen der DMSO Probe und der Estradiol Probe nachweisen (Abbildung 31 B). Die gleiche Intensität der *PduAktin* Bande zeigte, dass jeweils vergleichbare Mengen an DNA für die PCR eingesetzt wurden.

### 3.1.8 Das Xenoestrogen 17- $\alpha$ -Estradiol erzeugt den gleichen Effekt auf die Anzahl der Urkeimzellen wie Estradiol.

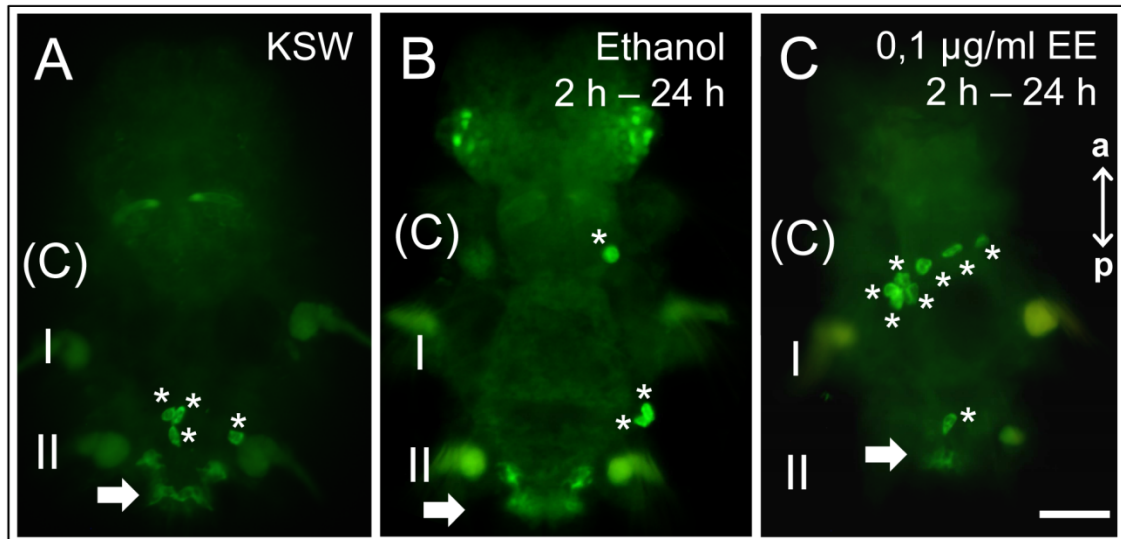
Xenoestrogene können die Wirkungsweise von natürlich vorkommenden Hormonen nachahmen. Da sie eine sehr ähnliche Struktur haben, können sie an Hormonrezeptoren binden und die gleichen Effekte wie die Hormone hervorrufen. Es stellte sich die Frage, ob die durch Estradiol verursachten Effekte auch von Xenoestrogenen hervorgerufen werden können.



**Abbildung 32: Ethinylestradiol erzeugt überzählige Urkeimzellen.** Die Wirkung des Xenoestrogens ist wie die des Estradiol dosisabhängig und steigt zusammen mit der Konzentration an. Das Ethanol erzeugt auch in diesem Fall weniger als vier Urkeimzellen.

Es zeigte sich, dass das Xenoestrogen genau wie Estradiol zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Urkeimzellen führte. Die geringste Konzentration von 0,001 µg/ml erzeugte 24,3  $\pm$  3,4 % Larven mit erhöhter Urkeimzellen Anzahl. Eine Inkubation mit 0,01 µg/ml führte zu 22,5  $\pm$  0,7 %, mit 0,1 µg/ml zu 24,2  $\pm$  3,2 % Larven mit mehr als 4 Urkeimzellen (Abbildung 33). Die höchste eingesetzte Konzentration von 1 µg/ml erzeugte 30,4  $\pm$  7,1 % Larven mit überzähligen Urkeimzellen (Abbildung 32).





**Abbildung 33: Eine Inkubation zwischen 2 h und 24 h erzeugt überzählige Urkeimzellen.** (A) Kontroll Larven die nur in KSW gehalten wurden entwickeln vier Urkeimzellen. (B) Nach einer Inkubation mit Ethanol finden sich Larven mit weniger als vier Urkeimzellen. (C) Ethinylestradiol erzeugt Larven mit überzähligen Urkeimzellen. Grün: Vasa Expression. Die Urkeimzellen sind mit Sternen markiert, die Wachstumszone mit einem Pfeil. Markierung der Segmente: Cephalisierendes Segment (C), erstes Segment (I), zweites Segment (II). Das anteriore Ende der Tiere ist oben, das posteriore unten. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Diese Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit als Vorversuch bearbeitet und wurde in der Masterarbeit von Andreas Löwer ausführlich behandelt.

Eine Inkubation von 2 – 24 h mit dem Xenoestrogen 17- $\alpha$ -Ethinylestradiol führt ebenfalls zu einer höheren Anzahl der Urkeimzellen in *Platynereis dumerilii*.

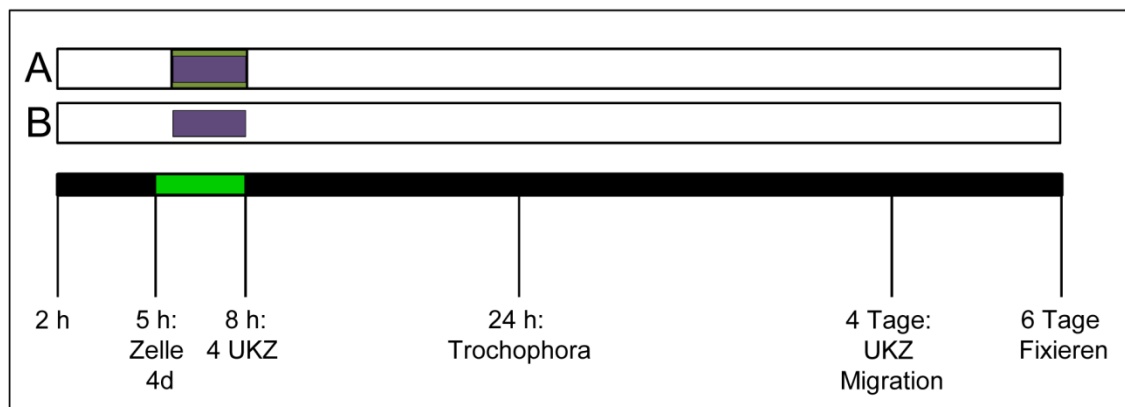
### 3.2 AKT und GSK3 $\beta$ sind an der Entstehung von überzähligen Urkeimzellen durch Estradiol beteiligt.

Im ersten Abschnitt konnte gezeigt werden, dass Estradiol einen Effekt auf die Anzahl der Urkeimzellen in *Platynereis dumerilii* hat. Außerdem wurde deutlich, dass der Estradiolrezeptor dabei eine Rolle spielt. Im Weiteren galt es nun zu klären, welche Signalwege an der Entstehung der überzähligen Urkeimzellen beteiligt waren. Ein möglicher Signalweg der für die Weiterleitung des Estradiolrezeptor Signals in Frage kommt, ist der AKT Signalweg. Zum einen gilt AKT als Regulator für Proliferation und Zellzyklus, und zum andern wurde bereits gezeigt, dass in den Urkeimzellen der Maus eine Aktivierung von AKT durch den Estradiolrezeptor erfolgt („Rapid Signaling“) (La Sala et al., 2010). Die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) kann unter anderem von AKT phosphoryliert und damit gehemmt werden.

Akt hemmt die GSK3, wodurch  $\beta$ -Catenin als Transkriptionsfaktor in den Zellkern wandern kann, da es nicht abgebaut wird. Beide Kinasen könnten also an der Signalweiterleitung des Estradiolrezeptors und somit an der Erhöhung der Urkeimzellen Anzahl beteiligt sein. Es entstand die Frage, ob eine Veränderung des  $\beta$ -Catenin Vorkommens in den Mesoblasten die Entwicklung der Urkeimzellen beeinflussen würde. Die Signalwege wurden jeweils mit spezifischen Inhibitoren beeinflusst, und die Urkeimzellen Anzahl im Anschluss daran bestimmt.

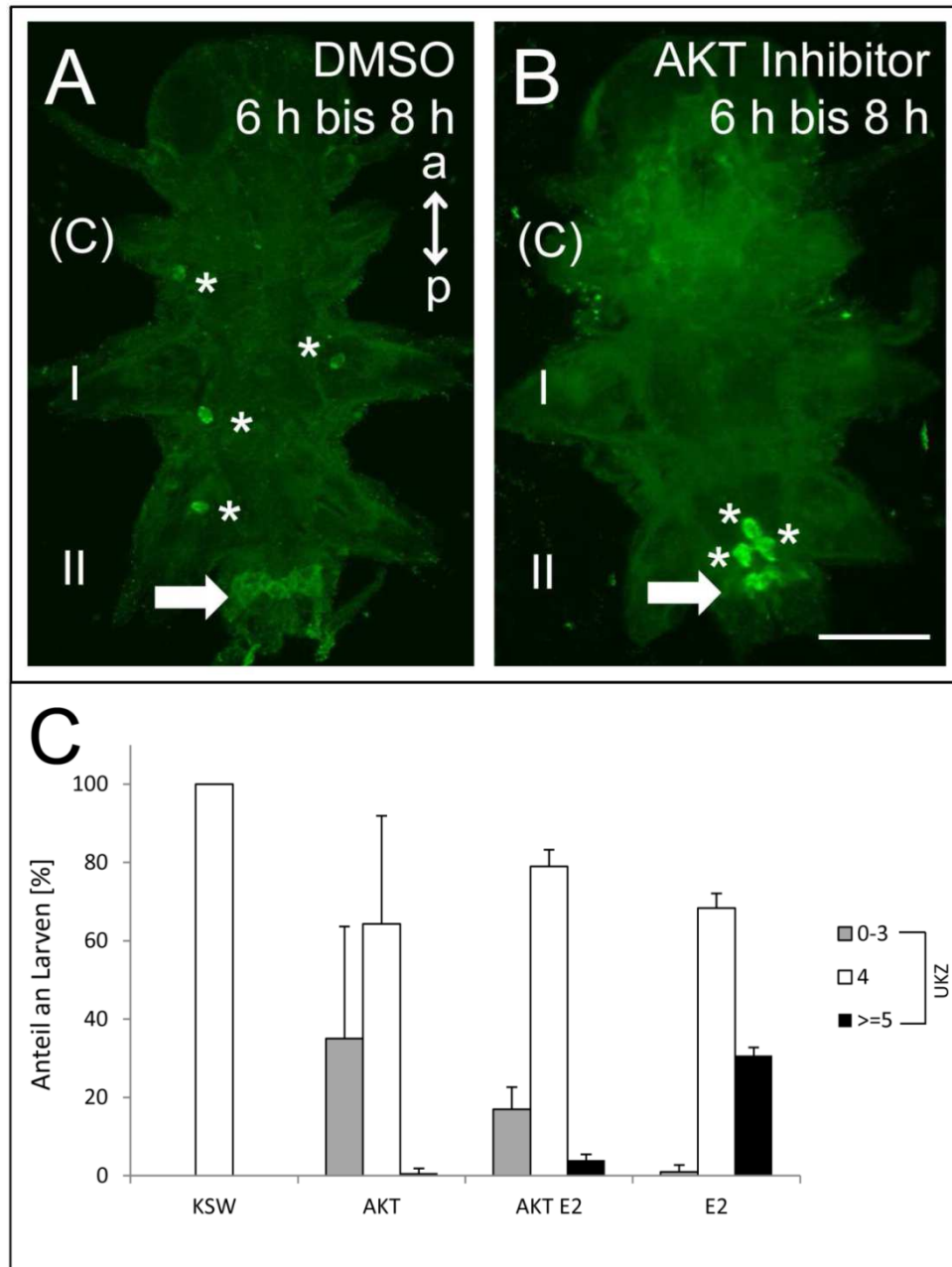
### 3.2.1 Der AKT Signalweg wird durch Estradiol aktiviert und führt zu einer erhöhten Urkeimzellen Anzahl.

Um zu untersuchen, ob bei *Platynereis* die Erzeugung überzähliger Urkeimzellen nach einer Behandlung mit Estradiol über AKT vermittelt wird, wurde eine gleichzeitige Inkubation von Estradiol und einem AKT Inhibitor von 5 h bis 8 h durchgeführt (Abbildung 34). Eine zweite Behandlung mit dem AKT Inhibitor alleine wurde durchgeführt, um einen direkten Einfluss des AKT Inhibitors auf die Urkeimzellen Anzahl auszuschließen.



**Abbildung 34: Inkubation mit Estradiol und dem AKT-Inhibitor.** Behandlung A: Der AKT Inhibitor (violette Balken) und Estradiol (grüner Balken) werden gemeinsam von 5 h bis 8 h inkubiert. Behandlung B: Die Embryonen werden im gleichen Zeitraum alleine mit dem AKT-Inhibitor inkubiert. Beide Ansätze decken die Entstehung der Urkeimzellen ab.

Eine gleichzeitige Inkubation des Inhibitors mit Estradiol führte dazu, dass  $79 \pm 4,2 \%$  der Larven die normale Anzahl von vier und  $17 \pm 7 \%$  weniger als vier Urkeimzellen aufwiesen. Der Inhibitor alleine erzeugte  $35 \pm 28 \%$  Larven die weniger als vier Urkeimzellen aufwiesen (Abbildung 35 C).

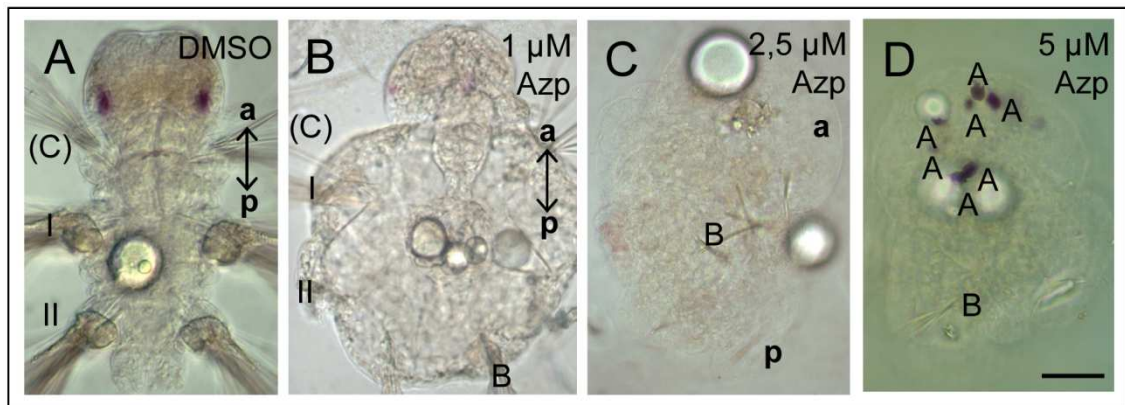


**Abbildung 35: Der AKT Inhibitor führt zu einer Veränderung der Anzahl der Urkeimzellen.** (A) Die Kontroll-Larven die nur mit DMSO behandelt wurden, haben vier Urkeimzellen. (B) Die Inkubation nur mit dem AKT Inhibitor führt zu weniger Urkeimzellen. (C) Durch gleichzeitige Behandlung mit Estradiol und dem AKT Inhibitor wird die Wirkung des Estradiol aufgehoben. Grün: Vasa Expression. Die Urkeimzellen sind mit Sternchen markiert, die Wachstumszone mit einem Pfeil. Markierung der Segmente: Cephalisierendes Segment (C), erstes Segment (I), zweites Segment (II). Das anteriore Ende der Tiere ist oben, das posteriore unten. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Eine Inhibierung des AKT Signalweges blockiert die Auswirkung von Estradiol auf die Urkeimzellen Anzahl. Der AKT Inhibitor alleine erzeugt Larven mit verringerter Urkeimzellen Anzahl.

### 3.2.2 Der GSK3 $\beta$ Inhibitor Azp erzeugt morphologische Effekte bei den behandelten Larven.

Aktivierte AKT hemmt die GSK3- $\beta$ , wodurch  $\beta$ -Catenin nicht abgebaut wird und in den Zellkern wandern kann. Der gleiche Effekt wird durch den GSK3- $\beta$  Inhibitor Azakenpaullone (Azp) hervorgerufen. Der Inhibitor wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M und 5  $\mu$ M) eingesetzt, um eine Auswirkung auf die Entstehung der Urkeimzellen in *Platynereis dumerilii* zu untersuchen. Bei einer Inkubation von 4 h bis 5 h fiel zunächst eine starke Beeinflussung der Achsenbildung der Larven auf:



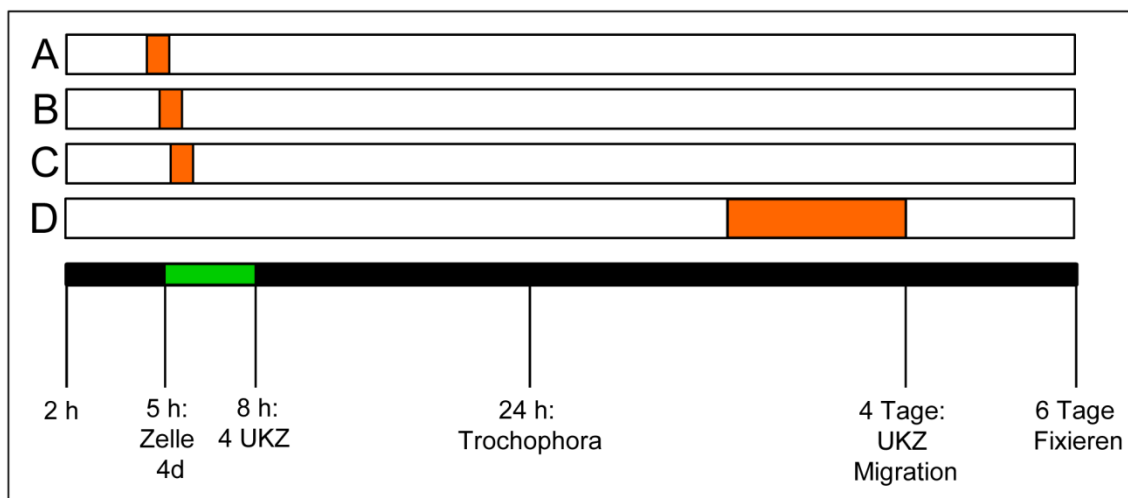
**Abbildung 36: Azakenpaullon erzeugt einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Morphologie der Larven.** (A) Larven, die als Kontrolle mit DMSO behandelt wurden, entwickeln sich normal. (B) Eine Behandlung mit 1  $\mu$ M Azp erzeugt bereits Veränderungen in der Morphologie. (C) eine Inkubation mit 2,5  $\mu$ M Azp führt zu einem stärker veränderten Aussehen. (D) Die größten Änderungen in der Morphologie treten bei 5  $\mu$ M Azp auf. A: Adultaugen, B= Borsten, a= anterior, p= posterior. Der Maßstab entspricht 50  $\mu$ m.

Larven, die mit der geringsten Konzentration von 1  $\mu$ M behandelt wurden, waren im Vergleich mit den höheren Konzentrationen am wenigsten beeinflusst. Die Körperachse der Larven war bei dieser Konzentration noch zu erkennen, genau wie die einzelnen Segmente. Die Larven waren jedoch stark aufgebläht (Abbildung 36 A). Die mittlere Konzentration von 2,5  $\mu$ M erzeugte Larven, deren Aussehen stärker verändert war, es ließ sich noch erkennen, wo sich Kopf und Schwanz der Tiere befanden, die einzelnen Segmente waren jedoch nicht mehr zu erkennen (Abbildung 36 B). Die höchste Konzentration 5  $\mu$ M führte zu Larven, deren Anterior-Posterior Achse nicht mehr zu bestimmen war. Die Larven wiesen eine kugelige Körperform auf und schienen fast nur aus Kopf zu bestehen. Weiterhin wurden in einigen Larven mehr als vier Adultaugen gefunden (Abbildung 36 C).

Der GSK3- $\beta$  Inhibitor Azp zeigt starke Auswirkungen auf die Morphologie der Larven. Der Effekt ist konzentrationsabhängig.

### 3.2.3 Die Anzahl der Urkeimzellen ändert sich abhängig vom Azp Inkubationszeitraum.

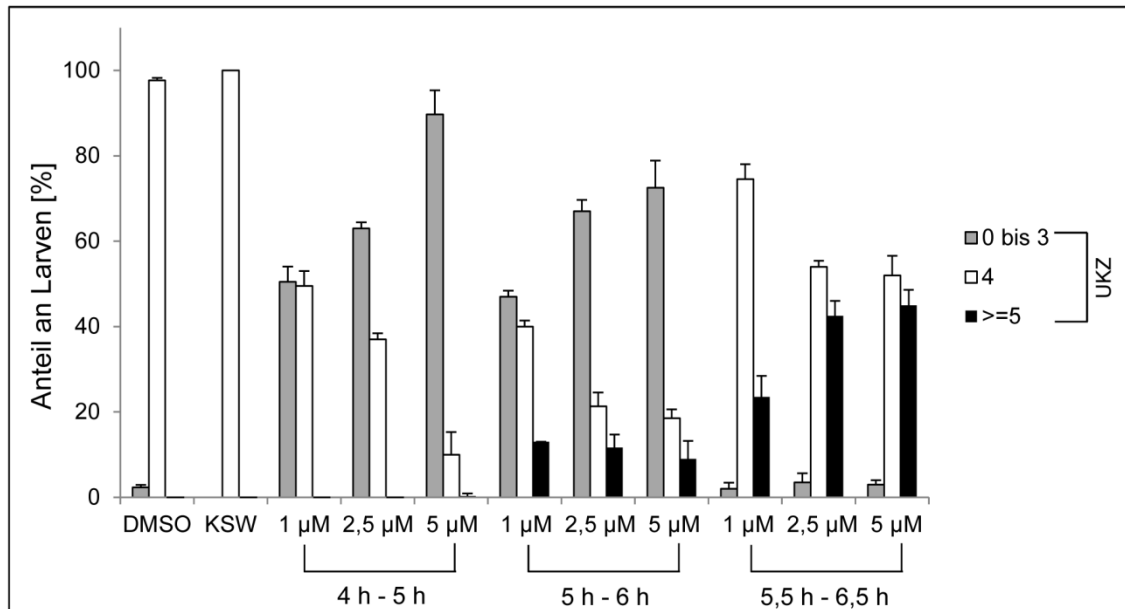
Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Inkubation mit Azp eine Auswirkung auf die Morphologie der Larven erzeugte, wurde nun untersucht, ob eine Wirkung auf die Anzahl der Urkeimzellen besteht. Hierzu wurden Embryonen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Azakenpaullon behandelt (Abbildung 37).



**Abbildung 37: Behandlungszeiträume mit dem GSK3 $\beta$  Inhibitor Azakenpaullon.** A: Eine Inkubation mit Azp (orange Balken) von 4 h bis 5 h erfasst die Entstehung des Mesoblasten 4d. B: In dem Zeitraum von 5 h bis 6 h teilt sich der Mesoblast und die beiden Vorläuferzellen der Urkeimzellen entstehen. C: Die Behandlung von 5,5 h bis 6,5 h beeinflusst die Entstehung des ersten Urkeimzellen Paares. D: Ab 4 Tagen beginnen die Urkeimzellen mit der Migration zur primären Gonade.

Zunächst wurden die Embryonen zum Zeitpunkt der Entstehung des Mesoblasten mit dem Inhibitor behandelt. Dabei wurden die gleichen Konzentrationen an Azp wie zuvor verwendet (Abbildung 37 A). Eine Auszählung der Urkeimzellen in 6 Tage alten Larven zeigte, dass viele Larven durch die Behandlung weniger als vier Urkeimzellen aufwiesen. Mit steigenden Konzentrationen wurde der Effekt stärker. Die geringste Konzentration von 1  $\mu$ M Azp erzeugte 50,5  $\pm$  3,5 % Larven mit weniger als vier Urkeimzellen. Bei einer Behandlung mit 2,5  $\mu$ M Azp wiesen 63  $\pm$  1,4 % der Larven weniger Urkeimzellen auf, bei 5  $\mu$ M waren es 89  $\pm$  5,6 % (Abbildung 38). Ein Problem, das bei dieser Behandlung auftrat, war dass sich aufgrund der stark veränderten Morphologie der Larven nicht immer feststellen lies, ob es sich bei den Zellen, die durch den Vasa Antikörper angefärbt wurden, um Urkeimzellen oder Zellen der Wachstumszone handelte. Da in beiden das Vasa Protein vorliegt ließen sich die

Zellen nicht eindeutig zuweisen. Bei einer Inkubation während der Entstehung der beiden Tochterzellen 4d<sup>1</sup> und 4d<sup>2</sup> von 5 h bis 6 h (Abbildung 37 B) wiesen erneut viele Larven weniger als vier Urkeimzellen auf.

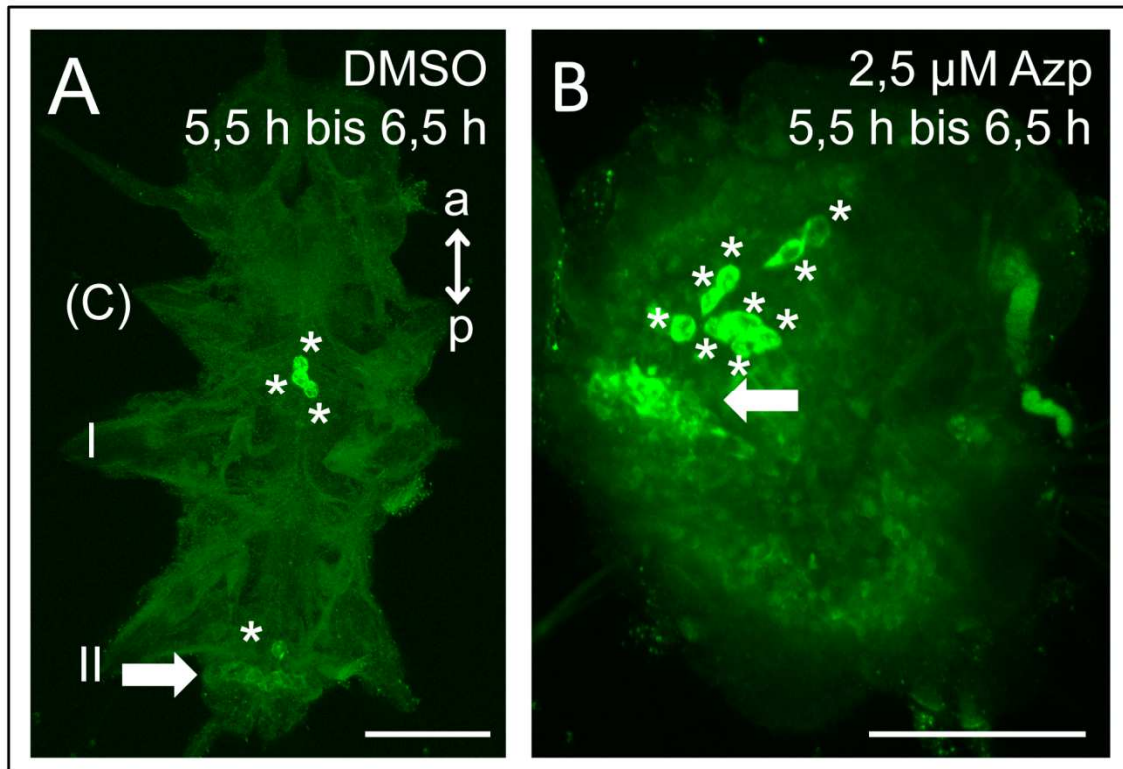


**Abbildung 38: Azakenpaullone verändert die Anzahl der Urkeimzellen abhängig von der eingesetzten Konzentration.** Eine Inkubation von 4 h bis 5 h erzeugt weniger als vier Urkeimzellen, der Effekt wird stärker mit steigender Konzentration. Das gleiche lässt sich bei einer Behandlung von 5 h bis 6 h beobachten, wobei sich hier zusätzlich in allen drei Konzentrationen auch Larven mit überzähligen Urkeimzellen zeigen. Dieser Effekt wird jedoch mit steigender Konzentration weniger. Eine Inkubation von 5,5 h bis 6,5 h erzeugt Larven mit mehr als vier Urkeimzellen, auch hier lässt sich eine Konzentrationsabhängigkeit feststellen. n=3 Ansätze je 100 Larven.

Auch in diesem Inkubationszeitraum war der Effekt konzentrationsabhängig und erzeugte bei 1 µM 47 +/- 1,4 %, bei 2,5 µM 67 +/- 2,6 %, und bei 5 µM 72 +/- 6,3 % Larven mit weniger als vier Urkeimzellen (Abbildung 38). Zusätzlich zu den Larven mit weniger Urkeimzellen traten bei dieser Inkubation jedoch auch Larven mit mehr als vier Urkeimzellen auf. Dieser Effekt wurde jedoch mit steigender Konzentration geringer. Die meisten Tiere mit erhöhter Urkeimzellen Anzahl traten bei einer Konzentration von 1 µM auf (13 +/- 0 %). 2,5 µM erzeugten 11 +/- 3 %, 5 µM führten zu 9 +/- 4 % Larven mit mehr als vier Urkeimzellen. Bei einer Inkubation von 5,5 h bis 6,5 h (Abbildung 37 C) war ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Urkeimzellen Anzahl zu beobachten; mit steigenden Konzentrationen entwickelten sich allerdings mehr Tiere, die eine erhöhte Anzahl an Urkeimzellen entwickelten und keine mit weniger als vier Urkeimzellen. Die Konzentration von 1 µM erzeugte 32 +/- 5 %, 2,5 µM 42 +/- 2,6 % und 5 µM 45 +/- 3,6 % Larven mit erhöhter Urkeimzellen Anzahl (Abbildung 38). Auch bei diesem Behandlungszeitraum erschwerten die morphologischen Veränderungen



die Auswertung. Weitere Versuche wurden von Anita Grund basierend auf diesen Ergebnissen in einer Bachelorarbeit vertiefend bearbeitet. Dabei zeigte sich, dass sogar bei noch niedrigeren Konzentrationen überzählige Urkeimzellen entstanden, die Larven wiesen dabei weniger morphologische Schäden auf.

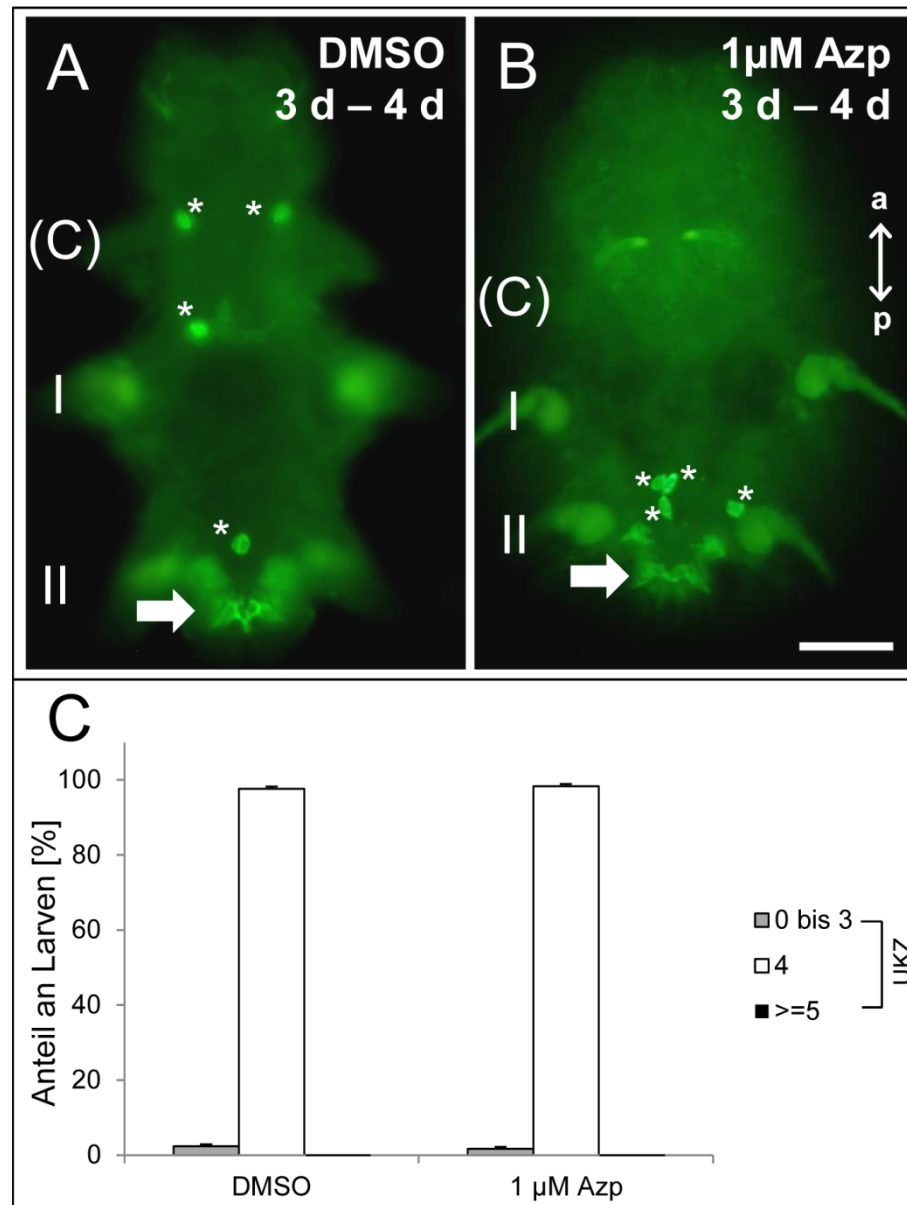


**Abbildung 39: Eine Behandlung mit Azakenpaullon führt von 5,5 h bis 6,5 h zu einer erhöhten Urkeimzellen Anzahl.** (A) Die mit DMSO behandelten Larven wiesen vier Urkeimzellen auf. (B) Eine Behandlung mit Azp führt neben einer stark veränderten Morphologie der Larve zu mehr als vier Urkeimzellen. Grün: Vasa Expression. Die Urkeimzellen sind mit Sternen markiert, die Wachstumszone mit einem Pfeil. Markierung der Segmente: Cephalisierendes Segment (C), erstes Segment (I), zweites Segment (II). Das anteriore Ende der Tiere ist oben, das posteriore unten, soweit diese erkennbar waren. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Werden die Embryonen von 4 h bis 5 h mit dem GSK3 $\beta$  Inhibitor Azp behandelt, entwickeln sich bei einem Teil der Larven weniger als vier Urkeimzellen. Bei einer Behandlung von 5 h bis 6 h entstehen sowohl Larven mit weniger, als auch mit mehr Urkeimzellen. Die Morphologie der Larven wird in beiden Fällen stark beeinflusst. Eine Behandlung mit Azp von 5,5 h bis 6,5 h erzeugt eine erhöhte Anzahl an Urkeimzellen. Die Larven weisen auch bei dieser Behandlung eine stark veränderte Morphologie auf.

Nachdem eine Auswirkung von Azp auf die Entwicklung der Urkeimzellen gezeigt werden konnte, sollte die Frage beantwortet werden, ob Azp auch zu einem späteren Zeitpunkt eine Änderung in der Urkeimzellen Anzahl bewirken kann. Dazu wurde 1 µM

Azp von 3 bis 4 Tagen parallel mit DMSO als Negativkontrolle eingesetzt (Abbildung 37 D). Die Anzahl der Urkeimzellen veränderte sich durch diese Inkubation nicht: In der DMSO Kontrolle wurden  $97,6 \pm 0,5 \%$ , in den mit Azp behandelten Larven  $98 \pm 0,5 \%$  Tiere mit vier Urkeimzellen gefunden (Abbildung 40).

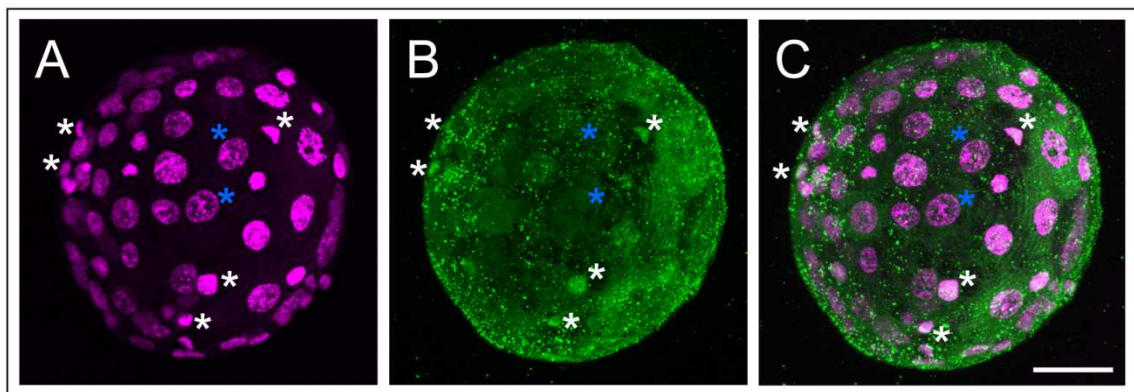


**Abbildung 40: Eine Inkubation mit Azp von 3 T bis 4 T zeigt keine Auswirkung auf die Urkeimzellen.** Sowohl in der Kontrolle (A), als auch in der mit Azp behandelten Probe (B) sind Larven mit vier Urkeimzellen zu finden. (C) Sowohl die mit DMSO behandelte Kontrolle, als auch die mit Azp behandelten Larven weisen hauptsächlich vier Urkeimzellen auf. Grün: Vasa Expression. Die Urkeimzellen sind mit Sternchen markiert, die Wachstumszone mit einem Pfeil. Markierung der Segmente: Cephalisierendes Segment (C), erstes Segment (I), zweites Segment (II). Das anteriore Ende der Tiere ist oben, das posteriore unten. Der Maßstab entspricht  $50 \mu\text{m}$ . (C)



### 3.2.4 $\beta$ -Catenin lässt sich nur schwierig in *Platynereis* Embryonen anfärben.

Die Ergebnisse die im vorigen Abschnitt präsentiert wurden, warfen die Frage auf, ob die Inkubation mit dem GSK3 $\beta$  Inhibitor tatsächlich zu einer veränderten  $\beta$ -Catenin Verteilung in den einzelnen Zellen führte. Um diese Frage beantworten zu können, wurden immunohistochemische Untersuchungen an Embryonen durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Antikörper gegen  $\beta$ -Catenin verwendet, ein Antikörper gegen humanes  $\beta$ -Catenin von der Firma Enzo, sowie ein von Stephan Schneider gegen  $\beta$ -Catenin aus *Xenopus* hergestellter Antikörper (Schneider et al., 1996) welcher von Thomas Kurth zur Verfügung gestellt wurde. Mit dem *Xenopus* Antikörper war es möglich das  $\beta$ -Catenin in den Zellkernen anzufärben, jedoch war es nicht möglich diese Färbung zuverlässig zu reproduzieren. Als Gegenfärbung wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt.



**Abbildung 41:  $\beta$ -Catenin lässt sich in 10 h alten Embryonen anfärben.** (A) Mit DAPI wurden die Zellkerne als Kontrollfärbung angefärbt. (B)  $\beta$ -Catenin lässt sich in einigen Zellkernen des Embryos nachweisen. (C) Überlagerung der beiden Färbungen. Die stärksten gefärbten Zellkerne sind in beiden Abbildungen mit weißen Sternen markiert. Die blauen Sterne markieren Zellkerne ohne  $\beta$ -Catenin Signal. Magenta: Propidium Jodid, Grün:  $\beta$ -Catenin. Der Maßstab entspricht 20  $\mu$ m.

Die gefärbten Embryonen hatten ein Alter von 10 h und wiesen eine schwache Färbung einiger Zellkerne auf (Abbildung 41). Zu der nicht reproduzierbaren Färbung kam noch das Problem die Urkeimzellen in den gefärbten Embryo zu finden, sowie das leider nicht genug Antikörper für weitere Färbungen zur Verfügung stand. Der Antikörper der Firma Enzo erzeugte keinerlei Färbung in den Embryonen.

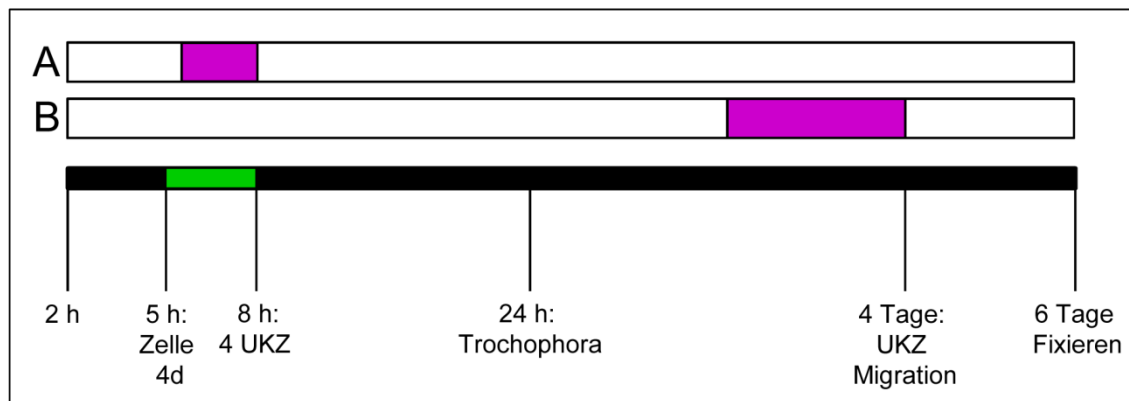
Keiner der verwendeten Antikörper erzeugte eine reproduzierbare Färbung. Es lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob sich das Vorkommen von  $\beta$ -Catenin nach der Behandlung mit dem Inhibitor verändert hat.

### 3.2.5 Immunohistologische GSK3 $\beta$ Färbung bei Embryonen.

Neben dem oben beschriebenen Versuch die Wirkung des GSK3 $\beta$  Inhibitors über eine Änderung des  $\beta$ -Catenin Vorkommens nachzuweisen, wurde auch ein Antikörper gegen phosphorylierte GSK3 $\beta$  eingesetzt. Embryonen wurden direkt nach einer Azp Behandlung fixiert und mit unbehandelten Embryonen gleichzeitig einer immunhistologischen Färbung mit dem Antikörper unterzogen. Der eingesetzte Antikörper erzeugte keine Färbung in den Embryonen (ohne Abbildung).

### 3.3 Der FGFR Inhibitor SU5402 erzeugt eine verringerte Anzahl der Urkeimzellen.

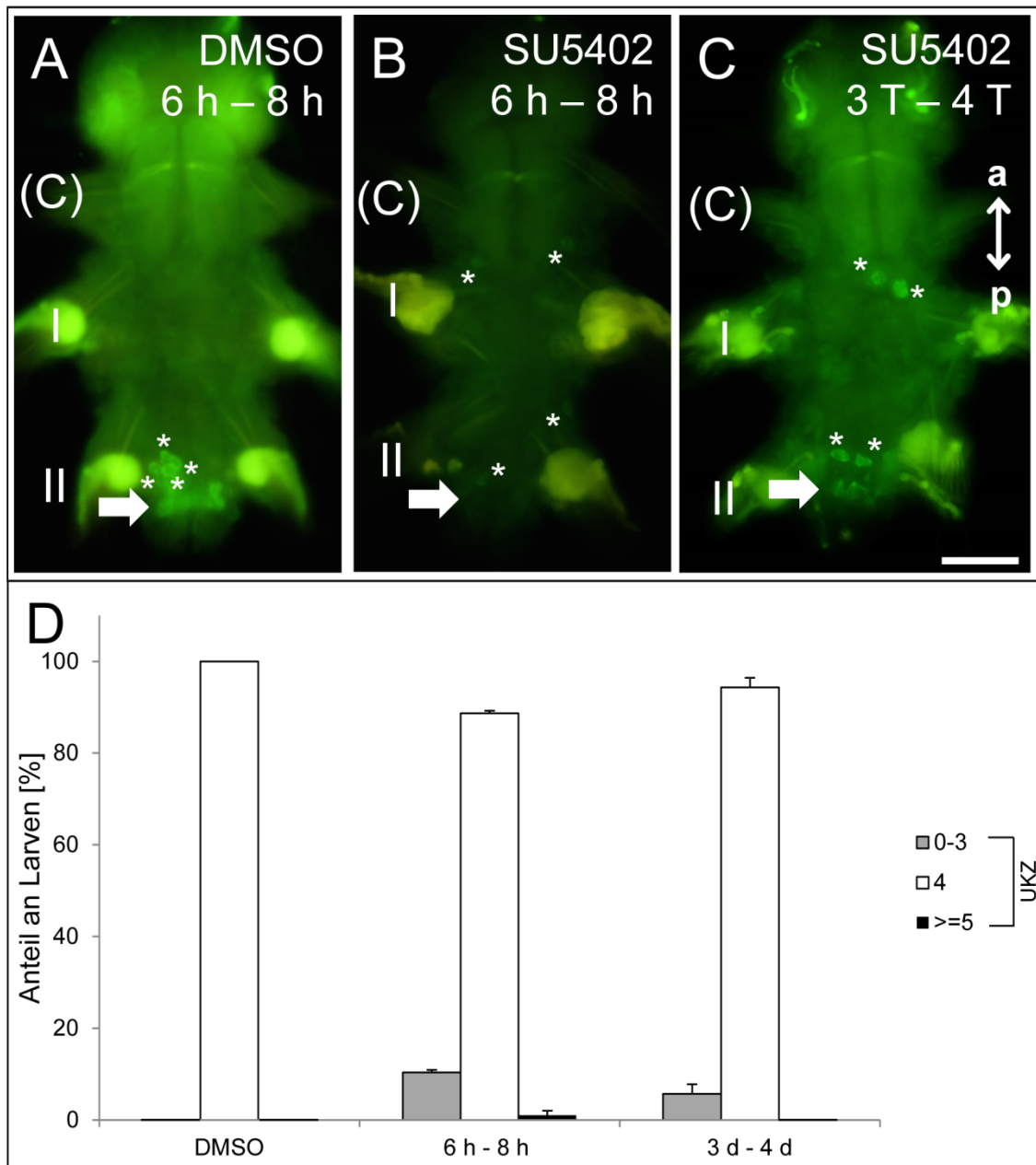
Die Behandlung mit SU5402 erfolgte in einer Konzentration von 20  $\mu$ M unter der Zugabe von 1 mM ATP, von 6 h bis 8 h, und von 3 bis 4 Tagen (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Inkubationszeiträume mit dem FGFR Inhibitor SU5402.** A: Die erste Inkubation mit SU5402 (magenta Balken) findet während der Entstehung der Urkeimzellen von 6 h bis 8 h statt. B: Eine weitere Inkubation erfolgt über den Zeitraum der beginnenden Migration von 3 bis 4 Tagen.

Damit wurde sowohl die Entstehung der Urkeimzellen, als auch ihre Migration abgedeckt. Die Inkubation von 6 h bis 8 h erzeugte 10,3  $\pm$  0,5 % Larven mit weniger Urkeimzellen. Bei der späteren Inkubation von 3 bis 4 Tagen hatten 5,7  $\pm$  2 % Larven weniger Urkeimzellen (Abbildung 43 D).

Durch den Einsatz des FGFR Inhibitors SU5402 wurden Larven mit weniger als vier Urkeimzellen erzeugt.



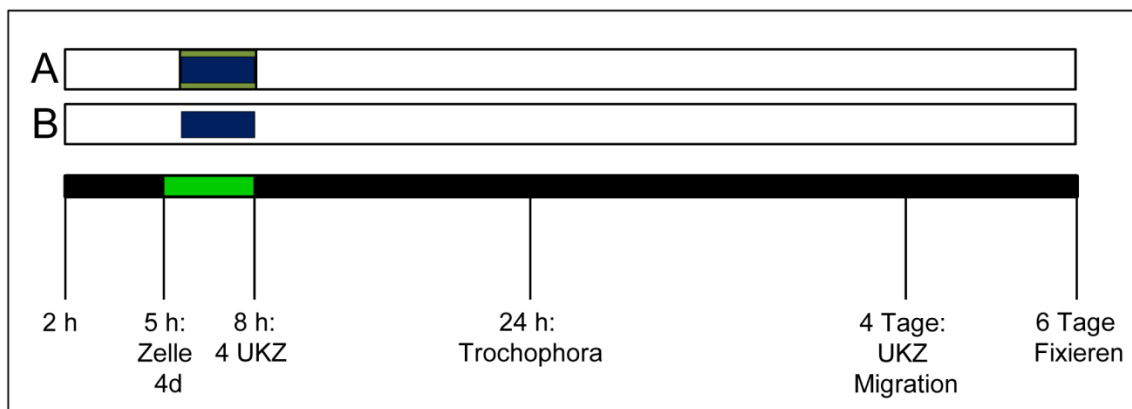
**Abbildung 43: SU5402 erzielt keinen Effekt auf die Urkeimzellen Anzahl.** (A) Die als Kontrolle mit DMSO behandelten Larven hatten die reguläre Urkeimzellen Anzahl. (B) Der Großteil der von 6 h bis 8 h mit SU5402 behandelten Larven zeigte ebenfalls vier Urkeimzellen, genau wie die von 3 bis 4 Tage behandelten Tiere (C). (D) Die von 6 h bis 8 h mit dem SU5402 behandelten Larven haben mit wenigen Ausnahmen vier Urkeimzellen, genau wie die zum späteren Zeitpunkt behandelten Larven. Grün: Vasa Expression. Die Urkeimzellen sind mit Sternen markiert, die Wachstumszone mit einem Pfeil. Markierung der Segmente: Cephalisierendes Segment (C), erstes Segment (I), zweites Segment (II). Das anteriore Ende der Tiere ist oben, das posteriore unten. Der Maßstab entspricht 50  $\mu$ m.

### 3.4 Der MAPK Signalweg wird sehr wahrscheinlich nicht durch den Estradiolrezeptor aktiviert.

Neben der ‚Rapid Signaling‘ Signalweiterleitung über Akt und die GSK3 $\beta$  gibt es für Estradiol eine weitere Möglichkeit der Signalweiterleitung über den MAP Kinase Signalweg. Durch eine Weiterleitung über Raf/Ras über den Estradiolrezeptor (ER) kann dieser aktiviert werden. Der spezifische MAP Kinase Inhibitor UO126 wurde verwendet, um einen Zusammenhang zwischen dem MAP Kinase Signalweg und dem ‚Rapid Signaling‘ zu untersuchen.

#### 3.4.1 Der MAPK Inhibitor UO126 hat keine Auswirkungen auf die Urkeimzellen Anzahl.

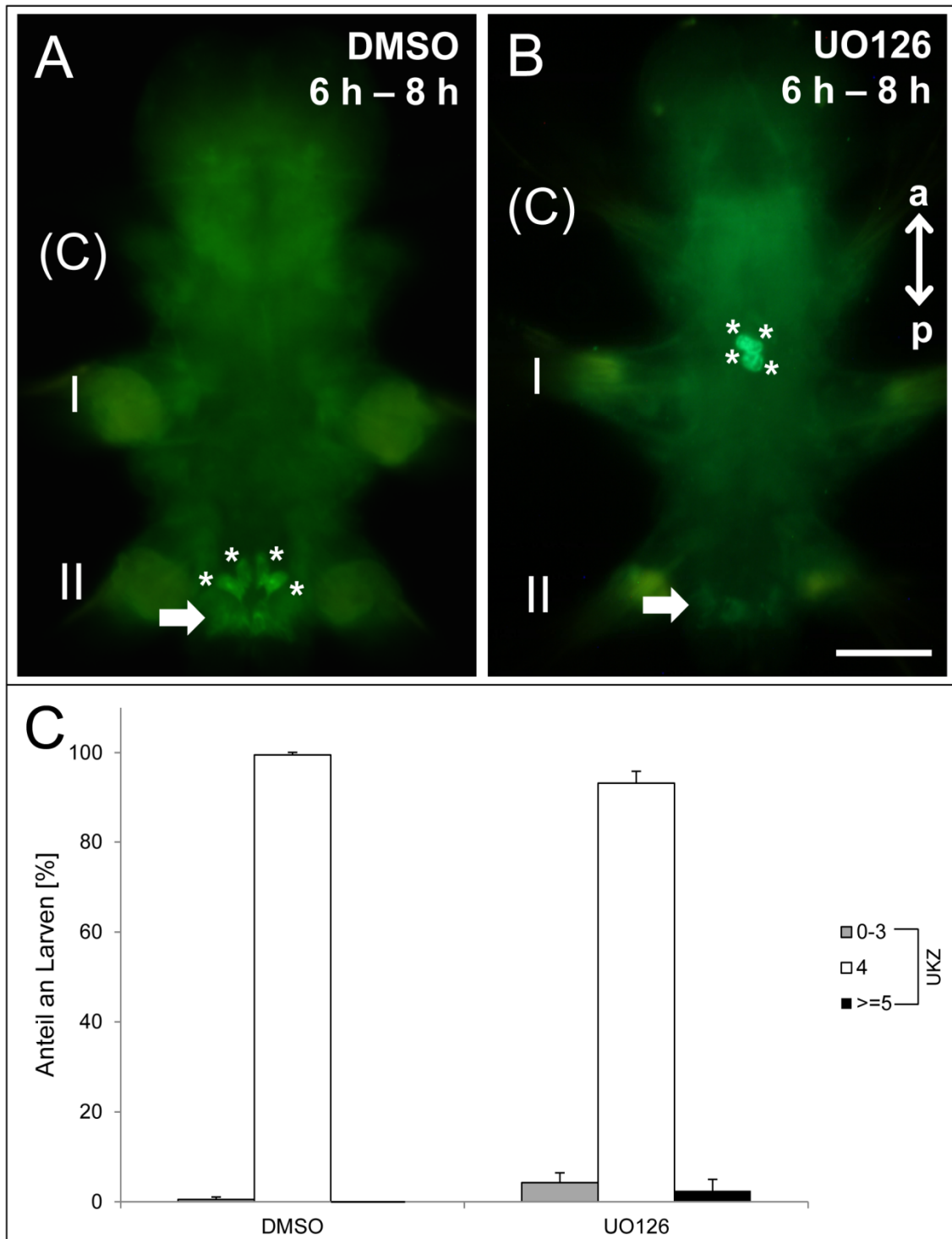
Der MAP Kinase spezifische Inhibitor UO126 wurde zunächst von 6 h bis 8 h (Abbildung 44 B) in einer Konzentration von 20  $\mu$ M inkubiert, um zu testen, ob er alleine eine Auswirkung auf die Larven hat.



**Abbildung 44: Behandlung mit dem MAPK Inhibitor UO126 und Estradiol.** A: Eine gleichzeitige Inkubation mit Estradiol (grüner Balken) und UO126 (blauer Balken) während der Entstehung der Urkeimzellen (6 h bis 8 h). B: Im gleichen Zeitraum erfolgt die Inkubation nur mit UO126.

Da die Larven diese Behandlung nicht überlebten, wurde die Konzentration auf 10  $\mu$ M gesenkt. Diese Konzentration war zwar nicht letal für die Tiere, die Larven wiesen jedoch weder Veränderungen in der Morphologie, noch in der Anzahl der Urkeimzellen auf (Abbildung 45).

Der Einsatz des MAP Kinase Inhibitors UO126 allein hat mit der eingesetzten Konzentration keine Auswirkungen auf die Entwicklung der Urkeimzellen.



**Abbildung 45: Der Inhibitor UO126 zeigt keine Auswirkung auf die Anzahl der Urkeimzellen.** (A) Die mit DMSO behandelten Larven wiesen vier Urkeimzellen auf, genau so die mit UO126 behandelten. (B). (C) Die mit UO126 behandelten Larven wiesen in geringen Mengen Larven mit mehr und weniger als vier Urkeimzellen auf. Der Großteil hatte jedoch wie die DMSO Kontrolle vier Urkeimzellen. Grün: Vasa Expression. Die Urkeimzellen sind mit Sternchen markiert, die Wachstumszone mit einem Pfeil. Markierung der Segmente: Cephalisierendes Segment (C), erstes Segment (I), zweites Segment (II). Das anteriore Ende der Tiere ist oben, das posteriore unten. Der Maßstab entspricht 50  $\mu$ m.

### **3.4.2 Eine kombinierte Behandlung mit UO126 und Estradiol hat eine letale Wirkung auf die Embryonen**

Nachdem im vorigen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass UO126 keine Auswirkung auf die Urkeimzellentwicklung hat, wurde die Beteiligung des MAP Kinase Signalweges an der Signalkette, ausgelöst durch Estradiol, untersucht. Dazu erfolgte eine gleichzeitige Behandlung mit 10  $\mu$ M UO126 und 0,1  $\mu$ g/ml Estradiol von 6 h bis 8 h (Abbildung 44 A). Diese kombinierte Behandlung führte dazu, dass alle Embryonen dieser Ansätze starben, während die Kontrollen überlebten. Der Versuch wurde mehrfach mit unterschiedlichen Gelegen durchgeführt und hatte immer zur Folge, dass sich die behandelten Tiere im Gegensatz zu den unbehandelten Kontroll-Tieren nicht entwickelten. Aus zeitlichen Gründen wurden keine weiteren Versuche mit anderen Konzentrationen angesetzt.

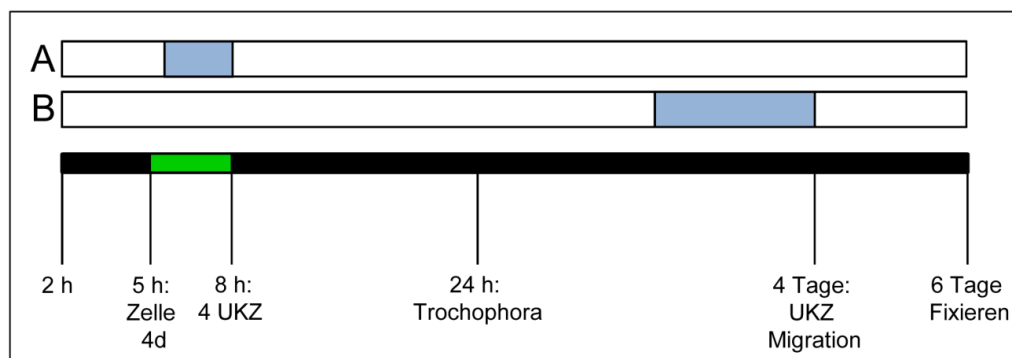
Eine Beteiligung des MAP Kinase Signalweges an der Signalweiterleitung des Estradiolrezeptors kann weder bestätigt noch ausgeschlossen werden, da die Embryonen die Versuche nicht überlebten.

### 3.5 Der Notch-Delta Signalweg scheint nicht an der Entstehung der Urkeimzellen beteiligt zu sein.

Neben AKT/ $\beta$ -Catenin und MAPK wurde außerdem die Auswirkung von einem weiteren Signalweg auf die Urkeimzellenentwicklung untersucht: Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Estradiol wurde hierbei nicht nur die Auswirkung auf die Entstehung der Urkeimzellen untersucht, sondern auch ob die Urkeimzellen nach einer Inkubation mit den entsprechenden Inhibitoren aus der Wachstumszone auswandern, um zur primären Gonade zu migrieren. Der Notch-Delta Signalweg wurde auf seine Beteiligung an der Urkeimzellentwicklung in *Platynereis dumerilii* untersucht, da in *Xenopus* gezeigt werden konnte, dass der Signalweg wichtig für die Migration der Urkeimzellen ist (Morichika et al., 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Signalweg in *Hydra* an der Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften, sowie deren Differenzierung beteiligt ist (Khalturin et al., 2007). Der  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor DAPT verhindert die Weiterleitung des Signalweges und wurde eingesetzt, um die Beteiligung des Notch Signalweges an der Urkeimzellen-Entwicklung in *Platynereis dumerilii* zu untersuchen.

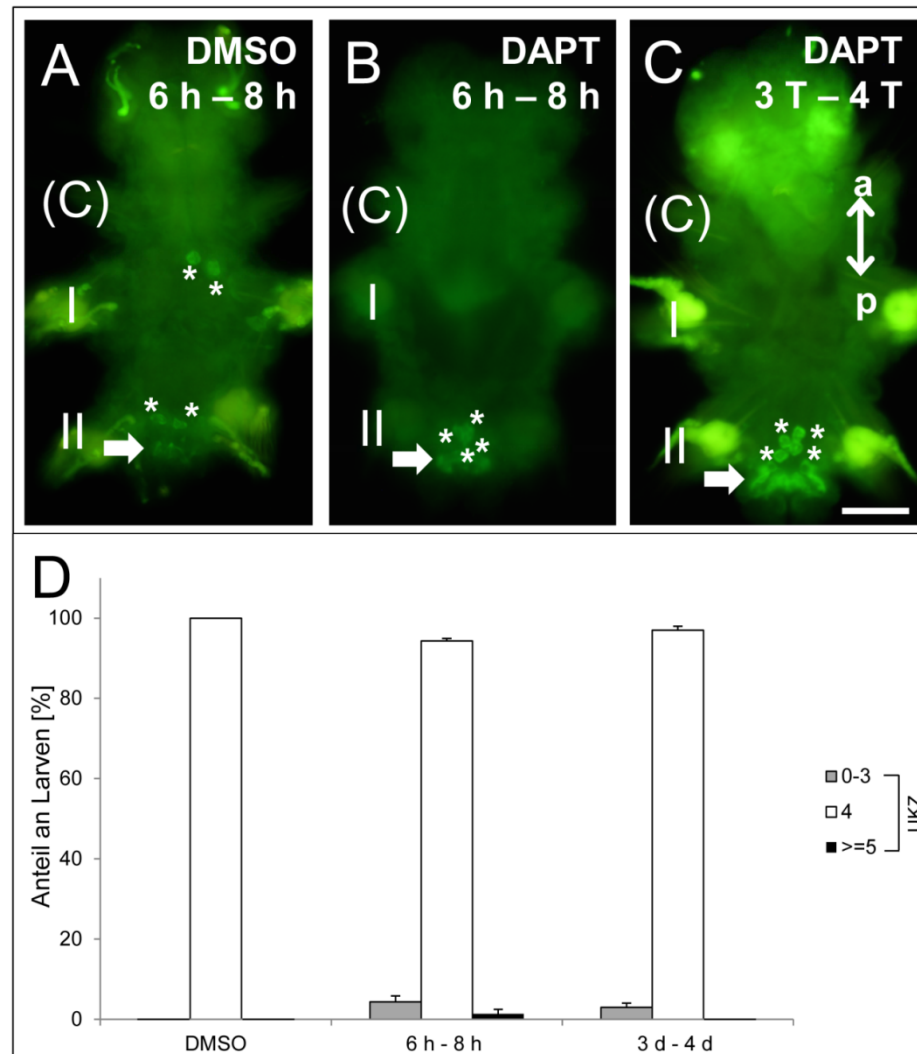
#### 3.5.1 Die Inhibierung des Notch-Delta Signalweges zeigt keine Auswirkungen auf die Anzahl der Urkeimzellen.

Der Inhibitor DAPT wurde in einer Konzentration von 25  $\mu$ M eingesetzt, um die Auswirkung des Notch-Delta Signalweges auf die Entwicklung der Urkeimzellen zu untersuchen. Die erste Inkubation erfolgte während der Entstehung der Urkeimzellen von 6 h bis 8 h, die zweite zu dem Zeitpunkt der Migration der Urkeimzellen von 3 Tage bis 4 Tage (Abbildung 46).



**Abbildung 46: Inkubationszeiträume mit dem  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor DAPT.** 1: Eine Inkubation mit DAPT (blaue Balken) von 6 h bis 8 h erfolgt während der Entstehung der Urkeimzellen. 2: Die zweite Inkubation findet zwischen 3 und 4 Tagen statt, während die Urkeimzellen beginnen in Richtung der primären Gonade zu migrieren.

Die 6 T alten Larven zeigten weder nach der frühen, noch nach der späten Behandlung einen Unterschied zu den nicht behandelten Kontrollarven. Die Larven wiesen alle vier Urkeimzellen auf, welche ohne erkennbaren Unterschied in Richtung primäre Gonade auswanderten (Abbildung 47).



**Abbildung 47: Eine Behandlung mit DAPT hat keine Auswirkungen auf die Urkeimzellen Entwicklung.** Die Kontrolle (A) zeigte genau wie die von 6 h bis 8 h behandelten Tiere (B) vier Urkeimzellen. Das gleiche Ergebnis erzielte eine Inkubation von 3 bis 4 Tagen (C). (D) Die Inkubation von 6 h bis 8 h erzeugte einen geringen Anteil an Larven mit sowohl mehr als auch weniger Urkeimzellen. Bei der späteren Inkubation fanden sich lediglich einige Larven mit weniger als vier Urkeimzellen. Grün: Vasa Expression. Die Urkeimzellen sind mit Sternen markiert, die Wachstumszone mit einem Pfeil. Markierung der Segmente: Cephalisierendes Segment (C), erstes Segment (I), zweites Segment (II). Das anteriore Ende der Tiere ist oben, das posteriore unten. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Der Notch-Delta Signalweg scheint in *Platynereis* keinen Einfluss auf die Entwicklung der Urkeimzellen oder ihre Migration zu haben.



### 3.6 Response Elements

Als Response Elements werden bestimmte DNA oder RNA Sequenzen bezeichnet an die Proteine binden, um deren Transkription, bzw. Translation zu beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Vorkommen von Estradiol Response Elements und Nanos Response Elements untersucht.

#### 3.6.1 Estradiol Response Elements (EREs)

Nachdem in immunohistologischen Färbungen gezeigt werden konnte, dass der Estradiolrezeptor bei *Platynereis* Embryonen in den großen Blastomeren im Zellkern nachgewiesen werden kann (Lidke et al., In Revision), kam die Frage auf, ob sich bei verschiedenen Genen Eres nachweisen lassen. Die stark konservierte Sequenz (siehe Abbildung 11) konnte jedoch in keiner der untersuchten Sequenzen gefunden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine EREs in den bekannten Sequenzen von *Platynereis* gefunden werden.

#### 3.6.2 Nanos Response Elements (NREs)

Der Keimzellmarker Nanos kann über Nres die Translation einer mRNA verhindern und so regulatorisch in die Abläufe in der Zelle eingreifen. Das NRE befindet sich dabei in der 3'-UTR der entsprechenden mRNA, welche durch die Bindung an Nanos nicht in ein Protein translatiert werden kann.

Ein Vergleich der Nre Sequenz (Zelada-Gonzales, 2005) mit der PduFGFR Sequenz (Steinmetz, 2002) zeigte, dass sich in der 3'UTR des FGFR sehr wahrscheinlich ein Nre befindet (Abbildung 48).

			*		140		*		160
PduFGFR	:	TAGTGATTC	CAGTGAAGT	GACTTCC	AGTAAGACAAAGATTA				
nanosres	:	TAGTGATCCCAGATT	GTAATTTATA	-----					
		TAGTGAT C		GT A TT A					

**Abbildung 48: Im 3'UTR der Sequenz des PduFGFR befindet sich sehr wahrscheinlich ein Nre.**

Es handelt sich um keine exakte Übereinstimmung der beiden Sequenzen, die Ähnlichkeit könnte jedoch sehr wahrscheinlich ausreichen, um eine Bindung von Nanos an die FGFR Sequenz zu ermöglichen.

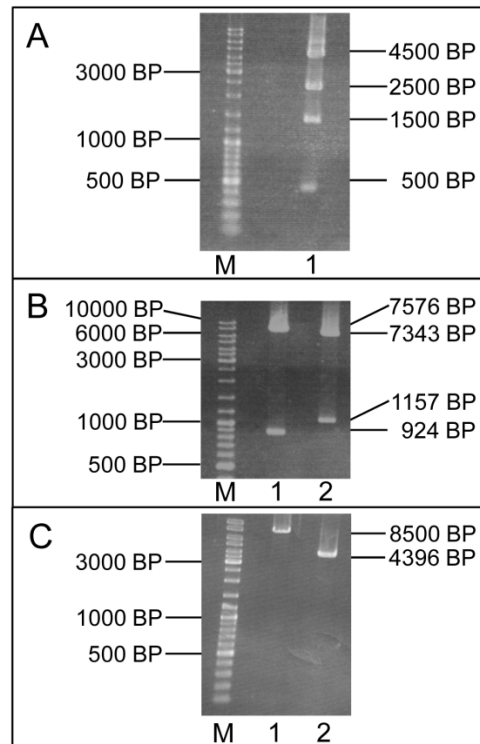
Im 3'UTR des PduFGFR konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit ein NRE identifiziert werden.

### 3.7 Weitere Ergebnisse

Während der Erstellung dieser Arbeit wurden weitere Ergebnisse erzielt, die sich keinem der oben aufgeführten Themen direkt zuordnen lassen.

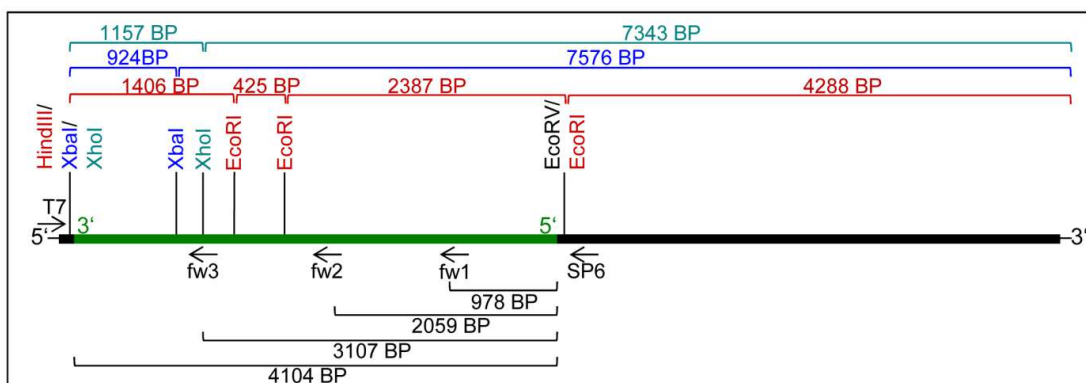
#### 3.7.1 Sequenzierung des Vasa Plasmids ‚Vasa ClonA‘

Das Insert des Plasmides ‚Vasa ClonA‘ wurde aus 48 h alter cDNA aus der cDNA Bank des EMBL hergestellt. Die Amplifizierung des *PduVasa* Inserts aus diesem Plasmid erzeugte in jeder PCR ein DNA Stück mit einer Größe von etwa 4000 BP. Es wurde jedoch nur ein Fragment in einer Größe von 2000 BP erwartet. Da von diesem Plasmid Sonden für eine ISH hergestellt werden sollten, musste die genaue Größe des Inserts ermittelt werden. Ein Verdau des Vektors mit den Enzymen EcoRI und HindIII ergab 4 Fragmente der Größe 4288 BP, 2387 BP, 1436 BP und 425 BP (Abbildung 49 A). Erwartet wurden jedoch 2, eins der Größe 4396 BP, welches der Größe des Vektors pCMV•SPORT6 entsprach, und eines unbekannter Größe für das Insert. Ein weiterer Verdau mit dem Enzym XbaI, sowie einer mit dem Enzym XhoI ergaben jeweils zwei Fragmente, und gaben keinen Aufschluss über die Größe des klonierten Fragmentes (Abbildung 49 B). Um auszuschließen, dass es sich bei dem Konstrukt nicht um einen anderen Vektor als den pCMV•SPORT6 handelte, wurden ein leerer Vektor und der ‚Vasa ClonA‘ mit EcoRV verdaut. In beiden Fällen wurden die Vektoren durch diesen Verdau linearisiert. (Abbildung 49 C).



**Abbildung 49: Der Verdau des Vektors Vasa ClonA mit verschiedenen Enzymen erzeugte nicht die erwarteten Fragmente.** (A) Die Enzyme XbaI (1) und XhoI (2) erzeugten jeweils zwei Vektorfragmente. (B) Ein Verdau mit EcoRI und HindIII (1) erzeugte 4 unterschiedlich große Fragmente. (C) Das Enzym EcoRV linearisierte sowohl den Vektor mit dem Vasa Insert (1), als auch den leeren Vektor (2).

Im Anschluss daran wurde die Sequenz mittels einer Sequenzierung untersucht. Für den ersten Ansatz wurde der Primer SP6 verwendet, die dadurch erhaltene Sequenz war jedoch nicht vollständig. Im nächsten Schritt wurde der Primer ‚Vasa spec fw1‘ erstellt. Nachdem die Sequenzierung mit diesem Primer erneut nicht vollständig war, wurde zuerst der Primer, Vasa clon A fw2 spec 54‘, und danach noch der Primer, Vasa spec fw3‘ erstellt.



**Abbildung 50: Restriktionskarte des Vektors ‚Vase ClonA‘.**

Durch den Einsatz aller vier Primer und das Zusammenfügen der einzelnen Sequenzen ließ sich die vollständige Sequenz des *PduVasa* Fragmentes ermitteln (Abbildung 50). Seine Größe beträgt 4119 BP. Mit Hilfe der ermittelten Sequenz ließen sich auch die Ergebnisse der enzymatischen Verdauung erklären.

Die Größe des *PduVasa* Fragmentes im ‚Vasa Clon A‘ Plasmid beträgt 4119 BP (siehe Anhang 6.3.1).

### 3.7.2 Klonierung und Sequenzierung von *Pdu Aktin*

Im Zuge einer Multiplex PCR auf cDNA wurde jeweils als Kontrolle Aktin amplifiziert. Die Größe des erhaltenen Fragmentes betrug 350 BP. Die Sequenz des *PduAktin* war nicht bekannt, lediglich ein Fragment der Größe 222 BP wurde bisher sequenziert. Um die genaue Sequenz des PCR Amplifikats zu bestimmen, wurde dieses zunächst aus einem Agarosegel ausgeschnitten, und mit dem ‚NucleoSpin® Extract Plasmid‘ Kit aufgereinigt. Anschließend wurde das Fragment in den pGEM®-T Easy Vektor ligiert. Eine Sequenzanalyse ergab, dass das Fragment in 5' – 3' Orientierung in den Vektor eingebracht wurde. Um zu zeigen, dass es sich bei dem klonierten Fragment tatsächlich um Aktin handelt wurde für eine weitere Identifizierung die Sequenz mit der Aktin Sequenz verschiedener Organismen verglichen. Für den Vergleich wurden folgende Sequenzen benutzt:

**Tabelle 8: Für die Sequenzanalyse verwendete Aktin Sequenzen**

Organismus	GenBank Nummer	Größe
<i>Lumbricus terrestris</i>	X96514.1	1567 BP
<i>Aplysia californica</i>	X52868.1	2330 BP
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	J01202.1	2748 BP
<i>Haliotis midae</i>	GU263794.1	1314 BP

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit des sequenzierten Fragmentes zu den Aktin Sequenzen konnte das Fragment als Teil des *PduAktin* Gens identifiziert werden (Abbildung 51).

Pd-actin	:	GCCCCGTCATCAGGGTGTGATGGTCGGTATGGGTCA	:	180
Lumbricus	:	GCCCCGTCATCAGGGTGTGATGGTCGGTATGGGTCA	:	215
Aplysia	:	GCCCCAGGCATCAGGGTGTGATGGTTGGTATGGGCCA	:	205
Spurpuratu	:	GACCCGTCATCAGGGTGTGATGGTCGGTATGGGACA	:	666
Haliotis	:	GTCCCAGACATCAGGGCGTGATGGTCGGTATGGGTCA	:	156
G CCC G CATCAGGG GT ATGGT GGTATGGG CA				

**Abbildung 51 Ausschnitt des Sequenzvergleichs Aktin Sequenzen.** Der gesamte Sequenzvergleich ist im Anhang (6.3.2) zu finden.

Bei der Sequenz handelt es sich nicht um das gesamte *PduAktin* Gen, sondern um ein Fragment der Größe 385 BP.

### 3.7.3 Klonierung und Sequenzierung von *Pdu CyclinB1*.

Bei der Suche nach möglichen Zielgenen des Estradiolrezeptors in *Platynereis* konnte nur für *Pdu CyclinB1* ein PCR Produkt detektiert werden (Abbildung 31). Um nachzuweisen, dass es sich bei dem PCR Produkt tatsächlich um das *CyclinB1* handelte, wurde das Fragment ebenso wie *PduAktin* wie oben beschrieben in den Vektor pGEM®-T Easy kloniert.

Ein Vergleich der *PduCyclinB1* Sequenz (GenBank: HE858370.1) ergab, dass es sich bei dem klonierten PCR Produkt um einen Teil des *PduCyclinB1* Gens handelt.

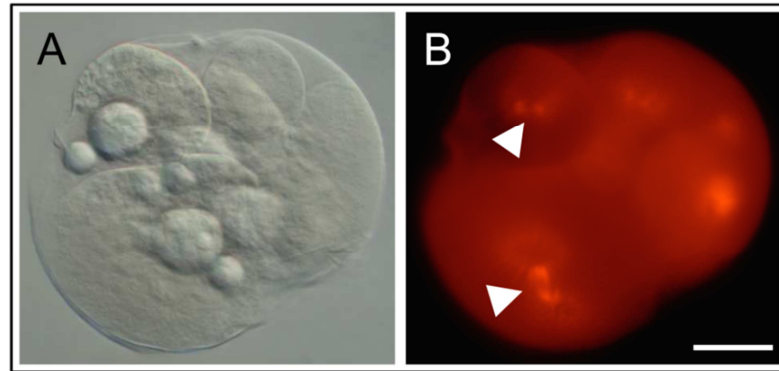
	140	*	160	*	180	
B1	:	AGAGAATCCTGTTGCTGCCCCAGAACTGGCAAAATCAAGGAAGA	:	127		
2	:	AGAGAATCCTGTTGCTGCCCCAGAACTGGCAAAATCAAGGAAGA	:	177		
AGAGAATCCTGTTGCTGCCCCAGAAAC*****						

**Abbildung 52: Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich.** Der gesamte Sequenzvergleich ist im Anhang (6.3.3) zu finden.

Bei dem PCR Produkt handelte es sich um ein Fragment des *PduCyclinB1* Gens.

### 3.7.4 Immunohistochemische Anfärbung von $\alpha$ -Tubulin.

Die Spindeln, die während einer Zellteilung die Chromosomen auseinander ziehen bestehen aus  $\alpha$ -Tubulin. Da sich diese Färbung gut dafür eignet, um Zellteilungen anzufärben, sollte sie für *Platynereis* etabliert werden um zeigen zu können, welche Zelle von welcher abstammt. Zunächst wurde die Antikörperfärbung nach dem  $\beta$ -Catenin-Protokoll durchgeführt (2.2.16). Gefärbt wurden Embryonen im Alter von 4 h.



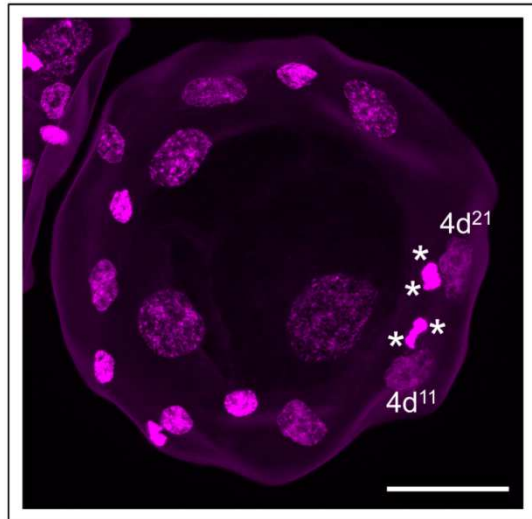
**Abbildung 53:  $\alpha$ -Tubulin lässt sich in *Platynereis dumerilii* Embryonen anfärben.** (A) Durchlichtaufnahme des 4 h alten Embryos. (B) Der Spindelapparat (Pfeil) ist bei allen in der optischen Ebene liegenden Zellen gut zu erkennen. Der Maßstab entspricht 20  $\mu$ m.

Die Spindeln in den Embryonen ließen sich auf diese Weise sehr gut anfärben (Abbildung 53). Im Weiteren wurde der Antikörper nach dem Standardprotokoll verwendet (2.2.15) und erzeugte bei gleichen Konzentrationen ebenfalls Färbungen der Spindelapparate.

Die immunohistochemische Färbung des  $\alpha$ -Tubulin in *Platynereis dumerilii* lässt sich als Kontrollfärbung für die Abstammung nutzen.

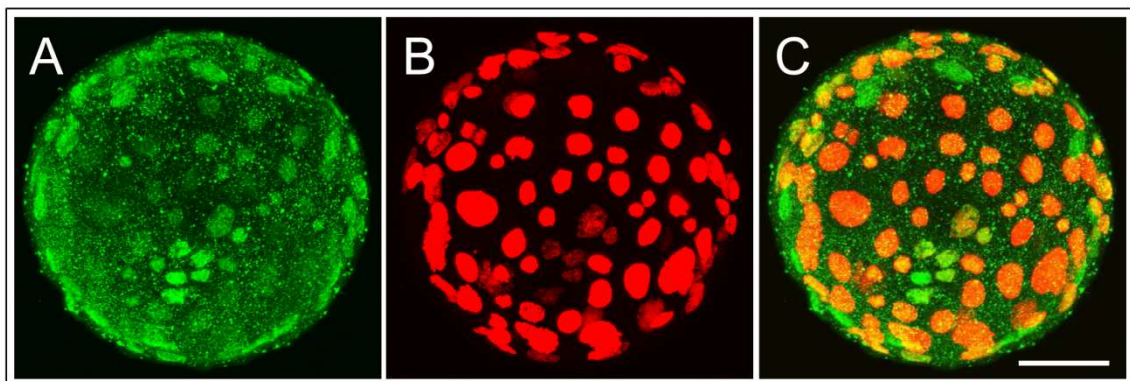
### 3.7.5 Markierung der Urkeimzellen in Embryonen von *Platynereis*.

Um zu zeigen, woher die überzähligen Urkeimzellen stammen und in welchem Alter sie entstehen, wurden verschiedene Techniken eingesetzt. Eine Anfärbung der Urkeimzellen in Embryonen mit dem Vasa Antikörper erwies sich als schwierig und nicht zuverlässig reproduzierbar im Gegensatz zu der Vasa Färbung in den Larven (ohne Abbildung). Eine Anfärbung der Zellkerne mit Propidium Jodid erzeugte zuverlässige Färbungen. Jedoch erwies es sich als sehr problematisch die Urkeimzellen im gefärbten Embryo zu erkennen. In eine Versuchsreihe mit Embryonen die im Alter von 8 h, 8 h 15 min, 8 h 30 min, 8 h 45 min und 9 h fixiert wurden, waren die Urkeimzellen nur in einem Embryo im Alter von 8 h 45 min auffindbar (Abbildung 54).



**Abbildung 54: Weder mit einer Kernfärbung noch einer EdU/H3K4 Färbung lassen sich die Urkeimzellen gut sichtbar machen.** (A) Die Propidium Jodid Färbung zeigt vier Urkeimzellen (Sterne) sowie deren Vorläuferzellen  $4d^{211}$  und  $4d^{111}$ . (B) In mit EdU und H3K4 gefärbten Embryonen sind die Urkeimzellen nicht zu erkennen. Der Maßstab entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Ein weiterer Versuch die Urkeimzellen anzufärben wurde mit Hilfe von EdU und einem  $\alpha$ -H3K4 Antikörper unternommen. Die Embryonen wurden von 4 h bis 5 h mit EdU behandelt, und im Alter von 10 h fixiert. Der H3K4 Antikörper färbt eine bestimmte Histonmodifikation an, die DNA markiert, die sich derzeit in einem Zustand befindet, indem sie nicht abgelesen werden kann, was auf die Urkeimzellen zutrifft. Die Färbung zeigte die EdU markierten Zellkerne, sowie Zellkerne die H3K4 angefärbt und nicht angefärbt waren. Die Urkeimzellen waren jedoch in den Embryonen nicht zu finden.



**Abbildung 55: Der Einsatz des H3K4 Antikörpers zusammen mit einer EdU Färbung macht die Urkeimzellen in einem 10 h alten Embryo nicht sichtbar.** (A) H3K4 Antikörper, (B) EdU Färbung, (C) Überlagerung der beiden Färbungen. Der Maßstab entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Die Urkeimzellen von *Platynereis* sind in Embryonen nur schwer anzufärben und zu finden.

## **4 Diskussion**



Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Signalkaskaden die an der Urkeimzellen Entwicklung in *Platynereis dumerilii* beteiligt sind. Hierbei zeigte sich, dass das Steroidhormon Estradiol die Produktion von überzähligen Urkeimzellen anregt. Im Normalfall entstehen in dem Polychaeten während der Embryonalentwicklung vier Urkeimzellen, die sich erst wieder im Alter von etwa drei Monaten zu teilen beginnen. Bis zu diesem Zeitpunkt durchlaufen die Urkeimzellen keine Zellteilung, was durch die Etablierung eines mitotischen Arrestes erreicht wird. Dieser wird sehr wahrscheinlich durch Nanos eingeleitet, welches in den Urkeimzellen von *Platynereis* nachgewiesen werden konnte (Rebscher et al., 2007). Solange dieser Arrest aufrechterhalten wird, findet in den Urkeimzellen keine Proliferation statt. Darüber hinaus konnte mit Hilfe von Inhibitoren die Beteiligung des AKT-Signalweges, der GSK3 $\beta$  und des FGF Rezeptors aufgezeigt werden. Die Beteiligung des MAP Kinase Signalweges, und des Notch-Delta Signalweges wurden ebenfalls untersucht, eine klare Aussage lässt sich zu diesen beiden Signalwegen jedoch anhand der durchgeführten Versuche nicht treffen.

#### **4.1 Estradiol bewirkt die Entstehung von überzähligen Urkeimzellen.**

##### **4.1.1 Hohe Konzentrationen von Estradiol führen zu einer erhöhten Urkeimzellen Anzahl.**

Eine Behandlung von *Platynereis* mit Estradiol führte ab einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{g/ml}$  zu einer signifikant erhöhten Anzahl an Urkeimzellen. Die eingesetzten Konzentrationen mussten dabei jedoch relativ hoch sein. Die natürliche Konzentration von Estradiol in der Coelomflüssigkeit von *Platynereis* ist bisher zwar nicht bekannt, jedoch die eines anderen Nereiden; in *Alitta virens* (ehemals *Nereis virens*) konnte eine Estradiol Konzentration von 6 – 40  $\text{pg/ml}$  festgestellt werden (García Alonso, 2005). Die Konzentration, mit der die meisten Ergebnisse dieser Arbeit erzielt wurden, lag um den Faktor  $10^4$  bis  $10^5$  höher. Auch verglichen mit anderen Studien war die hier verwendete Konzentration relativ hoch. Eine Behandlung mit E2 von Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) mit 5 – 200  $\text{pg/ml}$  sorgte für eine erhöhte Expression von Estradiolrezeptor und Vitellogenin mRNA (Ciocan et al., 2010). Der Effekt war hierbei jedoch erst nach einer Behandlung von 10 Tagen zu beobachten, das Estradiol wurde dabei jeden Tag bei einem Wasserwechsel frisch zugesetzt. Bei Urkeimzellen aus der Maus konnte ein proliferativer Effekt bei einer Behandlung mit 2,75  $\text{ng/ml}$  E2 erzeugt werden (La Sala et al., 2010). In diesem Fall wurden die Urkeimzellen jedoch in

Zellkultur gehalten und kamen bei der Behandlung in direkten Kontakt mit dem Estradiol. Im Gegensatz zu den Versuchen mit der Miesmuschel lag die Behandlungsdauer bei *Platynereis* mit unter 24 h jedoch wesentlich kürzer. Außerdem erfolgte die Behandlung an ganzen Embryonen und nicht, wie in der Studie mit den Urkeimzellen der Maus, in Zellkultur. Da es sich bei Estradiol um ein lipophiles Hormon handelt, könnte ein Hauptteil nach der Aufnahme von den Lipidtropfen der Embryonen aufgenommen worden sein, sodass den Zellen letztlich eine wesentlich geringere Konzentration zur Verfügung stand. Es ist auch nicht auszuschließen, dass ein Teil des im Seewasser gelösten Estradiols an die Wände der verwendeten 6-Well-Plates gebunden hat, und somit die eigentliche Konzentration der Lösung wesentlich geringer war. Es konnte aufgrund der geringen Größe der Embryonen nicht ermittelt werden, wie viel von dem eingebrachten Estradiol tatsächlich von den Tieren aufgenommen wurde und wie hoch die Konzentration innerhalb der Urkeimzellen war.

#### **4.1.2 Die überzähligen Urkeimzellen entstehen auch noch nach 8 h.**

Der Zeitpunkt der Entstehung der überzähligen Urkeimzellen ließ sich nicht mit Hilfe des Proliferationsmarkers EdU bestimmen. Es war jedoch möglich, eine Aussage über den Zeitraum in dem die Urkeimzellen entstanden zu treffen. Die unbehandelten Tiere wiesen bei einer EdU Inkubation von 8 h bis 24 h keine markierten Urkeimzellen auf, was bedeutet, dass die Urkeimzellen vor 8 h entstehen. In den behandelten Larven waren im Gegensatz dazu jedoch EdU markierte Urkeimzellen zu finden, was zeigt, dass auch noch nach 8 h Urkeimzellen entstehen.

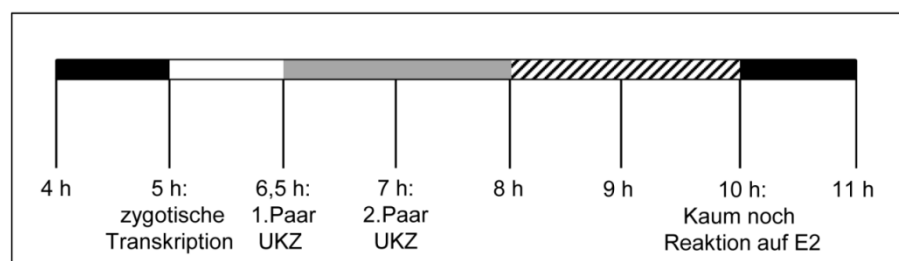
Die Frage nach dem Ursprung der überzähligen Urkeimzellen lässt sich auf diese Weise nicht beantworten. Sowohl eine weitere asymmetrische Teilung der Mesoblasten, also auch eine nicht vorgesehene Teilung der Urkeimzellen ist möglich. Ein Vergleich mit Urkeimzellen der Maus die sich nach einer Behandlung mit Estradiol teilen (La Sala et al., 2010), legt jedoch nahe, dass es sich wahrscheinlich um eine Teilung der Urkeimzellen handelt.

#### **4.1.3 Die Regulierung des Estradiolrezeptors und die Arretierung der Urkeimzellen bilden die Grenzen einer Behandlung mit Estradiol.**

Die ersten Versuche zeigten, dass die Urkeimzellen von *Platynereis* nur innerhalb eines begrenzten Zeitraumes von Estradiol beeinflusst werden konnten. Nur die Behandlung von 2 h bis 24 h zeigte einen Effekt, die von 24 h bis 6 Tage behandelten Larven zeigten die normale Anzahl von vier Urkeimzellen. In weiteren Versuchen zeigte sich, dass das Zeitfenster, in dem sich die Urkeimzellen mit Estradiol

beeinflussen lassen, eng limitiert ist. Zwischen 4 h und 5 h liegt der Beginn des Zeitfensters (Abbildung 21). Dieser Zeitpunkt liegt kurz vor dem Beginn der zygotischen Transkription des Estradiolrezeptors, welche zwischen 5 h und 6 h beginnt (Lidke et al., In Revision), was in etwa mit dem Einsetzen der zygotischen Transkription übereinstimmt (Dorrestijn, 1990; Rebscher et al., 2012). Durch In Situ Hybridisierungen konnte zwar schon zu früheren Zeitpunkten mRNA des Estradiolrezeptors nachgewiesen werden, jedoch ist die Aufgabe dieser mRNA noch nicht geklärt. Durch den Einsatz von ‚random Hexamer Primern‘ konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser vor 5 h nachweisbaren mRNA um maternale mRNA handelt (Lidke et al., In Revision). Die maternale mRNA liegt zu diesem Zeitpunkt sehr wahrscheinlich noch in einer Form vor, in der sie nicht translatiert wird (Mendez and Richter, 2001).

Ab einem Alter von 10 h lässt sich die Entwicklung der Urkeimzellen nicht mehr durch Estradiol beeinflussen. Das liegt sehr wahrscheinlich an einem mitotischen Arrest, der in den Urkeimzellen etabliert wird. Der mitotische Arrest wird bei anderen Spezies mit Hilfe des Proteins Nanos eingeleitet (Deshpande et al., 1999; Gilboa and Lehmann, 2004; Kadyrova et al., 2007; Köprunner et al., 2001; Subramaniam and Seydoux, 1999; Tsuda et al., 2003). Die arretierten Urkeimzellen weisen wenig bis keine aktive RNA Polymerase II auf, die Histonmodifikation H3K4, welche in aktiven Genen zu finden ist, kommt in ihnen nicht vor (Asaoka et al., 2010; Leatherman and Jongens, 2003). Auch bei *Platynereis* besteht die Möglichkeit, dass Nanos an der Etablierung des mitotischen Arrestes beteiligt ist. Nanos wird ab 5 h exprimiert und konnte in den Urkeimzellen nachgewiesen werden (Zelada-Gonzales, 2005). Wurde dieser Block einmal etabliert, hat eine Behandlung mit Estradiol keinen Einfluss mehr auf die Anzahl der Urkeimzellen. Werden die Embryonen aber mit Estradiol behandelt, bevor der Arrest etabliert werden kann, können sich die Urkeimzellen unplanmäßig teilen, bevor sie nach 8 h verspätet arretiert werden.



**Abbildung 56: Zeitfenster für eine Behandlung mit Estradiol.** Der längs schraffierte Bereich markiert den Zeitraum, in dem die Urkeimzellen unter normalen Umständen entstehen, der schräg schraffierte markiert den Zeitraum bis wann nach der Entstehung die Urkeimzellen noch durch Estradiol beeinflusst werden können.

Das Estradiol scheint also nur nach der Transkription des Estradiolrezeptors, und vor Eintreten des mitotischen Arrestes Einfluss auf die Entwicklung der Urkeimzellen nehmen zu können.

#### 4.1.4 Estradiol regt die Proliferation der Urkeimzellen an, ist jedoch nicht für deren Entwicklung nötig.

Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt wurde, tritt die Arretierung der Urkeimzellen nach einer Behandlung mit Estradiol verspätet ein. Dadurch können sich die Urkeimzellen vor der Etablierung des mitotischen Arrests teilen. Trotz der ermöglichten Zellteilung entstehen jedoch nicht unbegrenzt Urkeimzellen. Es scheint trotz der induzierten Proliferation einen Mechanismus zu geben, der die Zellteilung nach einiger Zeit wieder abstoppt. Für diese Regulierung kommen verschiedene Mechanismen in Frage:

Es besteht die Möglichkeit, dass die Arretierungsmechanismen, die sehr wahrscheinlich über Nanos etabliert werden, verzögert greifen, und die mittlerweile überzähligen Urkeimzellen in den mitotischen Arrest schicken. Es ist außerdem möglich, dass durch die Behandlung mit Estradiol mehr Cyclin als normal in den Urkeimzellen vorhanden ist. Wie in *Drosophila* gezeigt werden konnte, kann Nanos die Translation von Cyclinen regulieren (Asaoka-Taguchi et al., 1999; Kadyrova et al., 2007). Es könnte also sein, dass trotz der Anwesenheit von Nanos ein kleiner Teil des Cyclins translatiert wird. Auf diese Weise könnten die Urkeimzellen eine Teilung durchlaufen, bevor sie schließlich in den mitotischen Arrest eintreten.

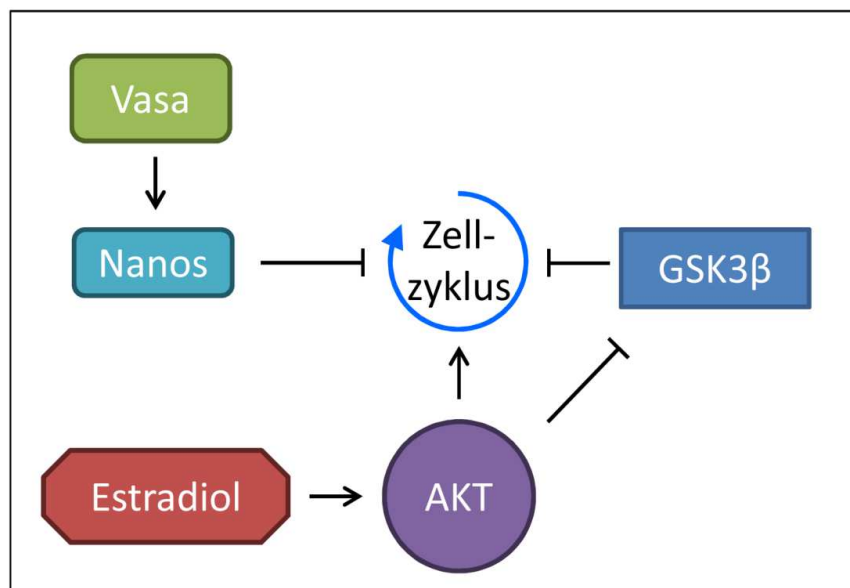
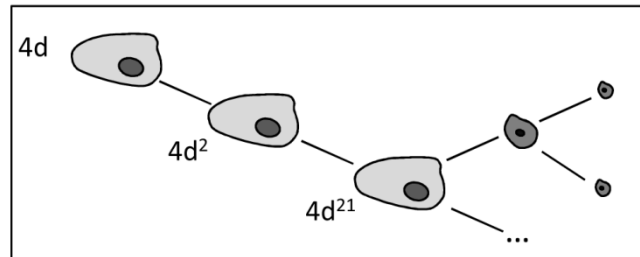


Abbildung 57: Schematische Darstellung der Regulation des Zellzyklus.

Ein weiterer möglicher Mechanismus, welcher die Proliferation der Urkeimzellen unterbinden würde, könnte darin liegen, dass die Urkeimzellen limitiert durch ihre geringe Größe nur eine bestimmte Anzahl an Teilungen durchlaufen können.



**Abbildung 58: Schematische Darstellung der Urkeimzellen Proliferation.** Die Urkeimzellen haben nach der Teilung ein zu geringes Volumen um eine erneute Teilung durchlaufen zu können.

Ab einer bestimmten Größe wäre das Verhältnis von Kern zu Plasma so gering, dass die Zelle keine weitere Teilung mehr durchlaufen kann. Die Zelle würde dann in einen Arrest gezwungen.

Obwohl Estradiol die Proliferation der Urkeimzellen anregen kann, ist es jedoch nicht für deren Entstehung nötig. Trotz einer Behandlung mit dem Estradiolrezeptor ICI während der Entstehung der Urkeimzellen entwickeln die Tiere die normale Anzahl von vier Urkeimzellen. Die Tatsache, dass Estradiol nicht für die Entstehung der Urkeimzellen nötig zu sein scheint, könnte auch eine Erklärung für die in 4.1.1 angesprochenen hohen nötigen Konzentrationen sein. Wäre Estradiol an der Urkeimzellen Entwicklung beteiligt, würden schon geringere Konzentrationen für eine Beeinflussung ausreichen. Stattdessen werden sehr hohe Konzentrationen benötigt, damit ein Effekt auf die Urkeimzellen Anzahl erzeugt wird.

#### **4.1.5 Aufgrund der geringen Anzahl der Urkeimzellen lassen sich Änderungen auf Transkript-Ebene nach einer Behandlung mit Estradiol nicht nachweisen.**

Bei dem Versuch, Änderungen von Transkripten von Zielgenen nach der Behandlung mit Estradiol zu finden, konnten keine Unterschiede im Vergleich mit unbehandelten Embryonen aufgezeigt werden. Verglichen wurden verschiedene Cycline, jedoch fand sich bei keiner RT-PCR ein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Eine Erklärung dafür ist die Tatsache, dass nach den Estradiol Inkubationen lediglich die Änderung der Urkeimzellen Anzahl zu beobachten war, und die weitere Entwicklung der Larven unverändert ablief. Die Estradiol-Tiere haben demnach etwa

eine bis fünf Urkeimzellen mehr als die normalen Larven, ein Unterschied, der zu gering ist, um Änderungen mittels RT-PCR sichtbar machen zu können.

Eine Möglichkeit, die zur Zeit nicht zur Verfügung steht, wäre die Urkeimzellen durch zum Beispiel FACS Sorting von den restlichen Zellen zu trennen und die RT-PCR nur von Urkeimzellen cDNA zu fertigen. In diesem Fall sollte ein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen auftreten. Solange jedoch keine transgenen *Platynereis* Stämme existieren, die GFP in den Urkeimzellen exprimieren, lässt sich ein solches Vorhaben nicht umsetzen.

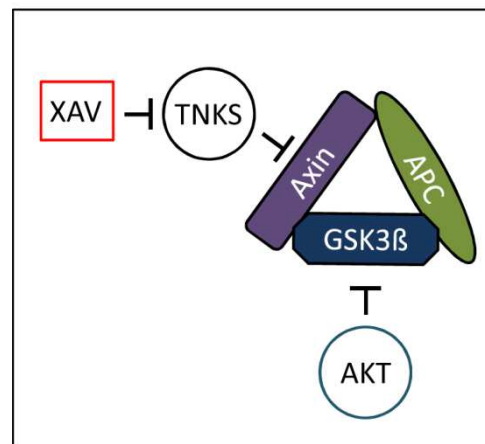
## **4.2 Die GSK3 $\beta$ scheint eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Arretierung der Urkeimzellen in *Platynereis* zu spielen.**

### **4.2.1 Der AKT-Signalweg steuert die GSK3 $\beta$ bei der Urkeimzellen Entwicklung.**

Bei der Entstehung der Urkeimzellen scheint die GSK3 $\beta$  eine wichtige Rolle zu spielen. Schneider und Bowerman konnten zeigen, dass in den Urkeimzellen kein  $\beta$ -Catenin im Zellkern zu finden ist, was auf eine aktive GSK3 $\beta$  hindeutet. Im Gegensatz dazu konnten sie zeigen, dass in den Mesoblasten  $\beta$ -Catenin in den Zellkernen vorkam. Daraus lässt sich folgern, dass die GSK3 $\beta$  in diesen Zellen inaktiv ist (Schneider and Bowerman, 2007). Um zu zeigen, dass die GSK3 $\beta$  und damit auch das Vorkommen von  $\beta$ -Catenin entscheidend für die Entwicklung der Urkeimzellen ist, wurde der GSK3 $\beta$  Inhibitor Azp eingesetzt.

Bei einer Inhibierung mit Azp während der Entstehung der Urkeimzellen (6 bis 8 h) entstanden, wie nach einer Behandlung mit Estradiol, mehr als vier Urkeimzellen. Ein Nachweis, dass  $\beta$ -Catenin nach dieser Behandlung auch im Zellkern der Urkeimzellen zu finden war, war leider aufgrund des unzuverlässigen Antikörpers nicht möglich. Das Ergebnis des Inhibitorversuches legt jedoch nahe, dass eine Änderung der GSK3 $\beta$ -Aktivität, und damit eine Änderung des Vorkommens von nukleärem  $\beta$ -Catenin zu einer Überproliferation der Urkeimzellen führte, bevor diese arretiert werden konnten. Zusammen mit den Daten von Schneider und Bowerman (Schneider and Bowerman, 2007) legen die Ergebnisse des Inhibitorversuches nahe, dass die GSK3 $\beta$  im Normalfall in den Mesoblasten inaktiv und in den Urkeimzellen aktiv zu sein scheint. Der Einsatz eines Antikörpers gegen phosphorylierte GSK3 $\beta$  sollte diese Theorie untermauern, der verwendete Antikörper erzeugte jedoch in einer immunhistologischen Untersuchung keine Färbung.

Die GSK3 $\beta$  kann durch AKT reguliert werden (siehe Abbildung 5) (Cross et al., 1995; Diehl et al., 1998; Frame and Cohen, 2001; Liang and Slingerland, 2003; Yang et al., 2006). Der Einsatz des AKT Inhibitors von 6 h bis 8 h führte zu einer verminderten Anzahl der Urkeimzellen, auch eine gleichzeitige Behandlung mit Estradiol und dem AKT Inhibitor zeigte einen Effekt. Die Larven wiesen die normale Anzahl von vier Urkeimzellen auf. Ein Zusammenhang zwischen AKT und GSK3 $\beta$  scheint also auch hier sehr wahrscheinlich zu sein. Abbildung 60 zeigt ein Modell, das die Verbindung von AKT und GSK3 $\beta$  in der Urkeimzellen Entwicklung von *Platynereis* verdeutlicht. In den Mesoblasten ist AKT aktiv, hemmt die GSK3 $\beta$ , und der Zellzyklus läuft ungehindert ab. Kann AKT aber durch den Einsatz des Inhibitors die GSK3 $\beta$  nicht hemmen, besteht die Möglichkeit, dass in den Mesoblasten ebenso wie in den Urkeimzellen, der Zellzyklus durch den Abbau von Cyclinen angehalten wird. Die Folgen davon wären, dass sich die Mesoblasten nicht teilen und weniger Urkeimzellen entstehen. Nachdem der Inhibitor entfernt wurde, läuft die Entwicklung des Embryos weiter, jedoch ohne dass sich alle Urkeimzellen gebildet haben. Anhand dieses Modells lässt sich auch erklären, warum eine Behandlung mit dem Tankyrase Inhibitor XAV939 ohne Wirkung auf die Urkeimzellen Anzahl bleibt (Grund, 2012).



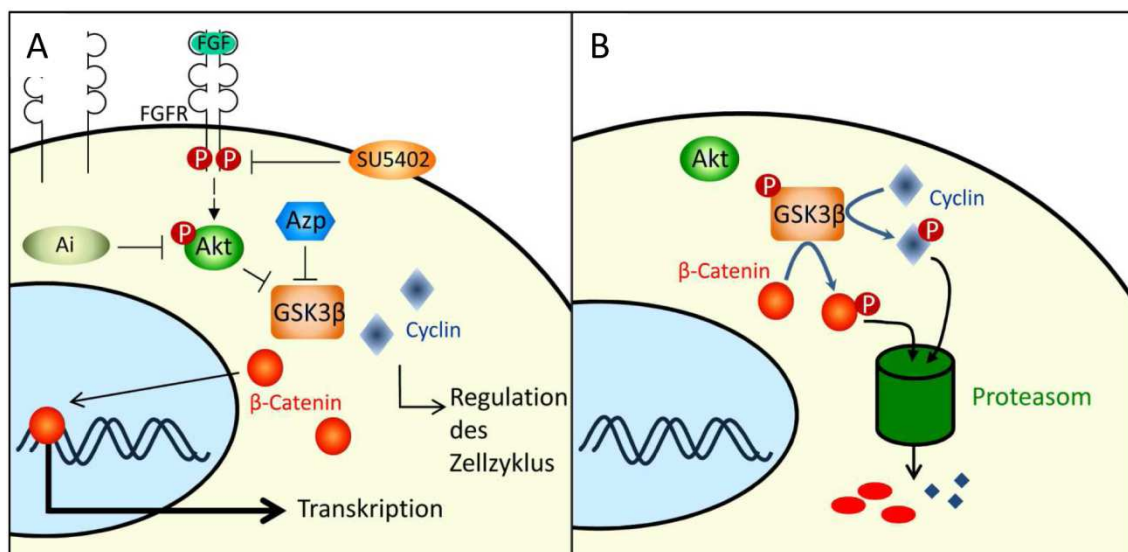
**Abbildung 59: Schematische Darstellung der Wirkung des Tankyrase Inhibitors XAV939.** XAV: XAV939, TNKS: Tankyrase, APC: Adenomatous-polyposis-coli Protein.

Durch das XAV939 wird Axin stabilisiert, welches zusammen mit GSK3 $\beta$  zu dem Komplex gehört, durch den  $\beta$ -Catenin degradiert wird (Liu and He, 2010; MacDonald et al., 2009). Die Idee hinter diesem Ansatz war, dem Effekt des Azp entgegen zu wirken, und durch vermehrt degradiertes  $\beta$ -Catenin eine verminderte Urkeimzellen Anzahl zu erzeugen. Da AKT die GSK3 $\beta$  direkt hemmt, kommt es trotz einer Stabilisierung des Axin nicht zu einer Degradierung des  $\beta$ -Catenins, da für den Vorgang der gesamte Komplex nötig ist. Trotz der Behandlung mit dem XAV939 entstehen vier Urkeimzellen

in den Larven. Der GSK3 $\beta$ -Axin-APC Komplex scheint also für die Entstehung der Urkeimzellen in *Platynereis* eine wichtige Rolle zu spielen, da eine fehlerhafte Regulierung zu einer abnormalen Anzahl der Urkeimzellen führt.

#### 4.2.2 Als Regulator für AKT kommt der FGF Rezeptor in Frage.

Da in verschiedenen Fällen eine Verknüpfung von AKT mit dem FGF Rezeptor dokumentiert wurde (Cotton et al., 2006; Kim and Snider, 2011; Lamothe et al., 2004), kam die Frage auf, ob in diesem Fall ebenfalls ein Zusammenhang bestehen könnte. Das Ergebnis der Inhibitorbehandlung mit SU5402 zeigte einen schwachen Effekt, dieser ähnelte jedoch dem des AKT Inhibitors. Die verringerte Anzahl an Urkeimzellen könnte durchaus daraus resultieren, dass durch Aktivierung des FGFR Signalweges AKT phosphoryliert und damit aktiviert wird, wodurch die in 4.2.1 beschriebene Hemmung von GSK3 $\beta$  ablaufen würden. Kommt das Signal des FGFR aber durch den Inhibitor nicht zustande, bleibt eine Phosphorylierung von AKT aus, was die gleiche Wirkung wie der AKT Inhibitor auf den weiteren Verlauf der Signalkette haben könnte. Eine Verbindung von FGFR und GSK3 $\beta$  über AKT ließ sich bereits in Zellkulturen nachweisen (Shimizu et al., 2008), weiterhin konnte eine Beteiligung dieser Signalkette an der Entwicklung von Vorläuferzellen zu differenzierten Zellen aufgezeigt werden (Kim and Snider, 2011). Die vorliegenden Daten lassen die Vermutung zu, dass die Regulierung von AKT bei der Urkeimzellen Entwicklung in *Platynereis* durch den FGFR erfolgen könnte, was sich jedoch erst durch weitere Versuchsansätze eindeutig bestimmen ließe.



**Abbildung 60: Modelle für die ablaufenden Signalwege bei der Entstehung der Urkeimzellen.** Die Modelle zeigen einen mögliche Verknüpfung von Signalketten in (A) Mesoblasten und (B) Urkeimzellen.



#### 4.2.3 Der FGFR könnte in den Urkeimzellen durch Nanos reguliert werden.

Das in Abbildung 60 beschriebene Modell geht davon aus, dass in den Urkeimzellen kein FGFR vorhanden ist. Die Identifizierung eines ‚Nanos response elements‘ stützt diese Theorie. Da Nanos in den Urkeimzellen von *Platynereis* nachgewiesen wurde, besteht die Möglichkeit, dass der FGFR durch die Anwesenheit von Nanos nicht translatiert wird. Die Folge davon wäre, nach dem oben aufgestellten Modell, dass in den Urkeimzellen  $\beta$ -Catenin auf Grund der aktiven GSK3 $\beta$  degradiert würde (Abbildung 60 B).

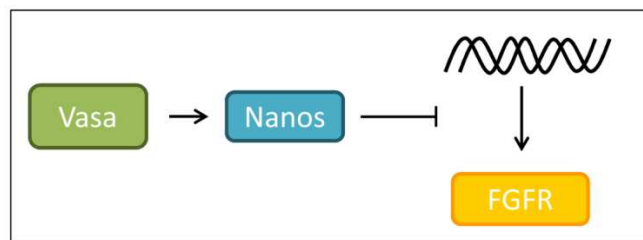


Abbildung 61: Die Translation des FGFR könnte durch Nanos reguliert werden.

#### 4.2.4 Die GSK3 $\beta$ könnte über Cycline an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sein.

Der Einfluss der GSK3 $\beta$  auf die Entwicklung der Urkeimzellen bei *Platynereis* entsteht sehr wahrscheinlich durch Cycline. Cycline sind Proteine, die für das Aufrechterhalten des Zellzykluses notwendig sind. Verschiedene Cycline sorgen dafür, dass während der Zellteilung die einzelnen Mitosephasen eingeleitet werden.

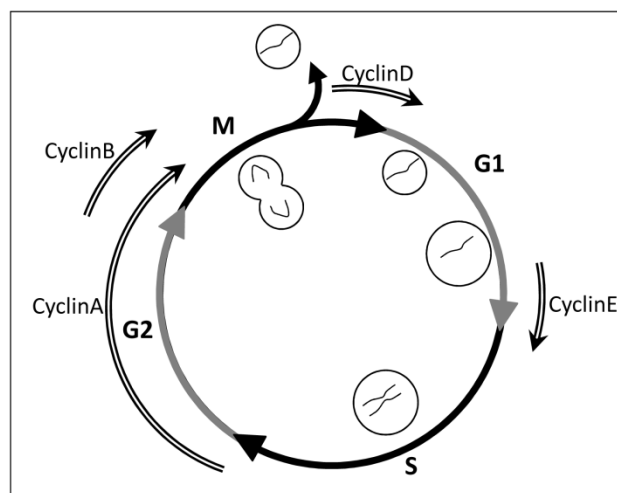


Abbildung 62 Schematische Darstellung des Zellzyklus und der daran beteiligten Cycline.

Die GSK3 $\beta$  kann neben  $\beta$ -Catenin auch Cycline phosphorylieren, was auch hier zu einer Degradierung durch das Proteasom führt. Weiterhin ist bekannt, dass  $\beta$ -Catenin

als Transkriptionsfaktor für Cyclin dient. Ist die GSK3 $\beta$  also inaktiv kann sich zum einen Cyclin ansammeln, und gleichzeitig kann mit Hilfe des Komplexes aus  $\beta$ -Catenin und TCF/LEF neues Cyclin transkribiert werden. Die Cyclin Konzentration steigt an, und der Zellzyklus wird angeregt. Im Gegensatz dazu sorgt eine aktive GSK3 $\beta$  dafür, dass Cyclin abgebaut wird, und verhindert durch den gleichzeitigen Abbau von  $\beta$ -Catenin die Transkription von neuem Cyclin.

#### **4.2.5 Der MAP Kinase Signalweg und der Notch-Delta Signalweg scheinen nicht direkt an der Urkeimzellen Entwicklung in *Platynereis* beteiligt zu sein.**

Sowohl der MAP Kinase Signalweg, als auch der Notch-Delta Signalweg können mit der GSK3 $\beta$  interagieren. Aktiviert über Wachstumsfaktoren kann die MAP Kinase Kaskade die GSK3 $\beta$ , wie auch AKT, regulieren (Saito et al., 1994). Es ist auch vorstellbar, dass die MAP Kinase neben der GSK3 $\beta$  an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt ist, und für die Herstellung von Cyclinen notwendig ist (Johnstone et al., 2012). Eine mögliche Interaktion zwischen GSK3 $\beta$  und dem Notch-Delta Signalweg, liegt darin, dass die Abspaltung der interzellulären Domäne von Notch durch aktive GSK3 $\beta$  verhindert werden kann (Kim and Snider, 2011). Aber auch Notch könnte direkten Einfluss auf den Zellzyklus über Cyclin nehmen, wie es bereits in *Drosophila* aufgezeigt wurde (Deng et al., 2001). In beiden Fällen konnte der Inhibitor jedoch keine Änderung an der Urkeimzellen Anzahl bewirken, was den Schluss zulässt, dass beide Signalwege entweder nicht an der Entstehung der Urkeimzellen beteiligt sind, oder aber ihre Beteiligung für die Entwicklung der Urkeimzellen nicht zwingend notwendig ist. Eine weitere nicht ausschließbare Möglichkeit ist jedoch auch, dass die Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren zu anderen Zeitpunkten oder mit anderen Konzentrationen als hier getestet durchgeführt werden muss, um einen Effekt auf die Anzahl der Urkeimzellen zu bewirken.

### **4.3 Welche Rolle spielt Estradiol in *Platynereis*?**

Wie im letzten Kapitel gezeigt wurde, findet die Entwicklung der Urkeimzellen von *Platynereis* in der Gegenwart des Estradiolrezeptor Inhibitor ICI ganz normal statt. Eine Behandlung mit ICI erzeugte Larven mit vier Urkeimzellen. Da aber gezeigt werden konnte, dass die Transkription des Estradiolrezeptors in *Platynereis* zwischen 5 h und 8 h hochreguliert wird (Lidke et al., In Revision), kommt die Frage nach seiner Aufgabe im Embryo auf.

#### **4.3.1 Estradiol ist an der Vitellogenin Synthese beteiligt.**

Javier García Alonso konnte in seiner Dissertation nachweisen, dass Estradiol in *Alitta virens* genau wie in Wirbeltieren die Bildung des Dotterproteins Vitellogenin stimuliert (García Alonso, 2005). Durch eine Behandlung mit Estradiol konnte bei weiblichen Würmern die Vitellogeninsynthese gesteigert werden. Auch bei männlichen Würmern konnte durch die Behandlung die Synthese von Vitellogenin angeregt werden, was für gewöhnlich nicht stattfindet. Außerdem erzeugten Langzeit-Inkubationen mit dem Xenoöstrogen Nonylphenol bei *Platynereis* lediglich weibliche geschlechtsreife Tiere (Garcia-Alonso et al., 2011).

#### **4.3.2 Der Estradiolrezeptor könnte als Transkriptionsfaktor dienen.**

Neben der Signalweiterleitung über AKT und die GSK3 $\beta$  gibt es für den Estradiolrezeptor noch weitere Möglichkeiten der Signalübermittlung. Der klassische Estradiolrezeptor Signalweg besteht darin, dass zwei Estradiolrezeptoren dimerisieren, nachdem sie Estradiol gebunden haben. Die Dimere wandern danach in den Zellkern und dienen dort selbst als Transkriptionsfaktoren. Sie binden an so genannte ‚Estradiol Response Elements‘ (ERE). In *Platynereis* konnte gezeigt werden, dass im Alter von 5 h, 7 h und 8 h der Estradiolrezeptor in einzelnen Zellkernen nachweisbar ist (Lidke et al., In Revision). Bei den so markierten Zellen handelt es sich um die großen Blastomeren des Embryos die sich in inäqualen Teilungen befinden. Der Estradiolrezeptor lässt sich dabei nur nukleär nachweisen, was den Rückschluss zulässt, dass in diesem Fall der klassische Signalweg abläuft. Über mögliche Zielgene lässt sich zu diesem Zeitpunkt keine Aussage treffen, da die Suche nach EREs in *Platynereis* im Rahmen dieser Arbeit nur auf wenige bekannte Sequenzen beschränkt war und dabei in keiner untersuchten Sequenz EREs gefunden wurden.

In 3 Tage alten Larven konnte zudem die mRNA des Estradiolrezeptors im Gehirn nachgewiesen werden (Lidke et al., In Revision). Dieses Ergebnis lässt den Rückschluss zu, dass Estradiol eine Aufgabe im Nervensystem von *Platynereis* hat. Welche Aufgabe das jedoch genau ist, lässt sich zum derzeitigen Zeitpunkt nicht weiter bestimmen.

#### **4.3.3 Der Eintritt in die Gametogenese könnte durch Estradiol induziert werden.**

Eine weitere Aufgabe von Estradiol könnte in der später erfolgenden Proliferation der Urkeimzellen in juvenilen Tieren liegen. Haben die Tiere eine Segmentanzahl von etwa

20 erreicht, so beginnen sich die Urkeimzellen in der primären Gonade zu teilen. Die Gonienballen wandern dann in die Coelomhöhle der Tiere ein, und wachsen dort in weiblichen Tieren zu Oocyten, in männlichen Tieren zu Spermatocyten heran. In vielen Säugetieren konnte gezeigt werden, dass Estradiol in männlichen Tieren für die Fertilität benötigt wird, und sehr wahrscheinlich an der Spermatogenese beteiligt ist (Albrecht et al., 2009; Bois et al., 2010; Hess, 2003; O'Donnell et al., 2001). Da Estradiol in *Platynereis* die vorzeitige Proliferation der Urkeimzellen erzeugen kann, wäre es nicht ausgeschlossen, dass es auch hier für die Gametogenese benötigt wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von Estradiol in juvenilen *Platynereis* hoch ist (García Alonso, 2005), was die Theorie einer Beteiligung des Estradiol bei der Gametogenese unterstützt.

#### **4.4 Xenoestrogene und *Platynereis*.**

Das Xenoestrogen Ethinylestradiol gehört zu den endokrinen Disruptoren. Es kann ähnliche Auswirkungen wie Estradiol auf das Hormonsystems eines Organismus nehmen. Im Gegensatz zu Estradiol werden Xenoestrogene jedoch dem Organismus künstlich von außen zugeführt. Sie können verheerende Auswirkungen auf den Organismus haben, wie zum Beispiel die Feminisierung von Fischen, die hohen Konzentrationen von Xenoestrogenen ausgesetzt waren (Aravindakshan et al., 2004; Johnson et al., 2008).

Die Urkeimzellen von *Platynereis* lassen sich durch Ethinylestradiol genauso beeinflussen wie durch Estradiol. Das Zeitfenster, in dem die Embryonen durch Ethinylestradiol beeinflusst werden können, ist dem ermittelten Zeitfenster für die Estradiol Behandlung sehr ähnlich (Löwer, 2013). Im Alter von 6 Tagen lässt sich der Effekt durch eine immunohistochemische Färbung nachweisen. Zusammen mit der Tatsache, dass sich *Platynereis* sehr gut unter künstlichen Bedingungen im Labor halten lässt, wäre eine Nutzung von *Platynereis* als Indikator für Belastung von Seewasser mit Xenoestrogenen denkbar. Dieses würde noch vereinfacht, durch die Existenz von transgenen *Platynereis* Stämmen, die GFP in den Urkeimzellen entwickeln, wodurch die immunohistochemische Färbung überflüssig würde.

#### **4.5 Ausblick**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Entwicklung der Urkeimzellen durch Estradiol über ‚Rapid Signaling‘ beeinflussen lässt. Weiterhin konnte die Beteiligung des FGF Rezeptors, AKT und GSK3 $\beta$  an der Entstehung der

Urkeimzellen gezeigt werden. Über die Auswirkungen und Zusammenarbeit der einzelnen Signalketten können jedoch zu diesem Zeitpunkt nur Theorien aufgestellt werden. Es ließe sich zum Beispiel durch den Einsatz von Antikörpern gegen die phosphorylierte und damit aktivierte AKT zeigen, dass nach einer Behandlung mit dem FGFR Inhibitor SU5402 weniger AKT aktiv ist. Außerdem ließe sich so zeigen, dass AKT durch Estradiol aktiviert werden kann, und somit an der Entstehung der überzähligen Urkeimzellen durch Estradiol beteiligt ist. Ein Problem hierbei ist jedoch, dass es keine Antikörper gegen die phosphorylierte AKT aus *Platynereis* gibt. Sollte kein käuflicher Antikörper eine Färbung erzeugen, besteht keine Möglichkeit die aktivierte AKT nachzuweisen.

Auch das Vorkommen von aktivierter GSK3 $\beta$  ließe sich mit Antikörpern nachweisen, aber auch hier besteht die Problematik einen funktionierenden Antikörper zu finden. Da der Nachweis von  $\beta$ -Catenin bereits teilweise erfolgen konnte, jedoch durch den Mangel an Antikörper keine weiteren Färbungen mehr durchgeführt werden konnten, sollte mit neu beschafftem Antikörper ein reproduzierbares Protokoll für die Färbung erstellt werden, um die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin in den Embryonen untersuchen zu können.

Um zu zeigen, in welchen Zellen und in welchem Alter der Estradiolrezeptor in *Platynereis* zu finden ist, wäre auch hier ein geeigneter Antikörper nützlich.

Um die Beteiligung verschiedener Signalwege an der Entwicklung der Urkeimzellen vollständig aufzuklären sind weitere Behandlungen mit den jeweiligen Inhibitoren nötig. So ist zum Beispiel noch nicht geklärt, ob der AKT Inhibitor bereits bei der Bildung des Mesoblasten 4d Einfluss auf die Entwicklung der Urkeimzellen nehmen kann. Interessant könnte auch eine Behandlung mit dem AKT-Inhibitor und Azakenpaullon von 4 h bis 5 h sein. Es könnte sein, dass ein eventueller Effekt des AKT Inhibitors durch das Azp aufgehoben würde, was ein weiterer Beweis für die Verkettung der AKT und der GSK3 $\beta$  in diesem Fall wäre.

Auch weitere Versuche mit dem FGFR Inhibitor SU5402 sollten durchgeführt werden. Sollte eine höhere Konzentration, oder eine Behandlung zu einem anderen Zeitpunkt das gleiche Ergebnis wie die Behandlung mit dem AKT Inhibitor erzeugen könnten, wäre die Wahrscheinlichkeit für ein Zusammenspiel zwischen dem FGFR und der AKT deutlich erhöht.

Ebenfalls sind weitere Ansätze mit den Inhibitoren des MAPK und Notch-Delta Signalweges nötig. Da im Zuge dieser Arbeit nur eine Konzentration zu einem

Zeitpunkt getestet wurde, bleiben noch viele Möglichkeiten für eine Beteiligung an der Urkeimzellen Entwicklung offen.

Sollten sich die im Rahmen dieser Arbeit aufgestellten Theorien über in Mesoblasten und Urkeimzellen ablaufenden Signalketten beweisen lassen, wäre ein erster Mechanismus für die Entstehung der Urkeimzellen aufgedeckt. Neben der Differenzierung der Urkeimzellen könnten diese Signalwege auch Hinweise darauf geben, wie der mitotische Arrest in den Urkeimzellen etabliert wird.

## **5 Referenzen**

- Ackermann, C., Dorresteyn, A., Fischer, A., 2005. Clonal domains in postlarval *Platynereis dumerilii* (Annelida: Polychaeta). *J Morphol* 266, 258-280.
- Albrecht, E.D., Lane, M.V., Marshall, G.R., Merchenthaler, I., Simorangkir, D.R., Pohl, C.R., Plant, T.M., Pepe, G.J., 2009. Estrogen promotes germ cell and seminiferous tubule development in the baboon fetal testis. *Biol Reprod* 81, 406-414.
- Aravindakshan, J., Paquet, V., Gregory, M., Dufresne, J., Fournier, M., Marcogliese, D.J., Cyr, D.G., 2004. Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*). *Toxicol Sci* 78, 156-165.
- Asaoka, Y., Sakai, H., Sasaki, J., Goryo, M., Yanai, T., Masegi, T., Okada, K., 2010. Changes in the gene expression and enzyme activity of hepatic cytochrome P450 in juvenile Sprague-Dawley rats. *J Vet Med Sci* 72, 471-479.
- Asaoka-Taguchi, M., Yamada, M., Nakamura, A., Hanyu, K., Kobayashi, S., 1999. Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol* 1, 431-437.
- Ayoola, J.A., García-Alonso, J., Hardege, J.D., 2011. Glutathione-S-transferase in *Nereis succinea* (Polychaeta) and its induction by xeno-estrogen. *Environ Toxicol* 26, 559-565.
- Bois, C., Delalande, C., Nurmio, M., Parvinen, M., Zanatta, L., Toppari, J., Carreau, S., 2010. Age- and cell-related gene expression of aromatase and estrogen receptors in the rat testis. *J Mol Endocrinol* 45, 147-159.
- Butcher, R.L., Collins, W.E., Fugo, N.W., 1974. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94, 1704-1708.
- Campolo, F., Gori, M., Favaro, R., Nicolis, S., Pellegrini, M., Botti, F., Rossi, P., Jannini, E.A., Dolci, S., 2013. Essential role of sox2 for the establishment and maintenance of the germ cell line. *Stem Cells* 31, 1408-1421.
- Carrera, P., Johnstone, O., Nakamura, A., Casanova, J., Jäckle, H., Lasko, P., 2000. VASA mediates translation through interaction with a *Drosophila* ylf2 homolog. *Mol Cell* 5, 181-187.
- Ciocan, C.M., Cubero-Leon, E., Puinean, A.M., Hill, E.M., Minier, C., Osada, M., Fenlon, K., Rotchell, J.M., 2010. Effects of estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*, at different stages of gametogenesis. *Environ Pollut* 158, 2977-2984.
- Cotton, L., Gibbs, G.M., Sanchez-Partida, L.G., Morrison, J.R., de Kretser, D.M., O'Bryan, M.K., 2006. FGFR-1 [corrected] signaling is involved in spermiogenesis and sperm capacitation. *J Cell Sci* 119, 75-84.
- Cox, L.E., Ferraiuolo, L., Goodall, E.F., Heath, P.R., Higginbottom, A., Mortiboys, H., Hollinger, H.C., Hartley, J.A., Brockington, A., Burness, C.E., Morrison, K.E., Wharton, S.B., Grierson, A.J., Ince, P.G., Kirby, J., Shaw, P.J., 2010. Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One* 5, e9872.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B.A., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S.A., Jordan, V.C., Katzenellenbogen, J.A., Korach, K.S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M.G., Gustafsson, J.A., 2006.



- International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 58, 773-781.
- Deng, W.M., Althausen, C., Ruohola-Baker, H., 2001. Notch-Delta signaling induces a transition from mitotic cell cycle to endocycle in *Drosophila* follicle cells. *Development* 128, 4737-4746.
- Deshpande, G., Calhoun, G., Yanowitz, J.L., Schedl, P.D., 1999. Novel functions of nanos in downregulating mitosis and transcription during the development of the *Drosophila* germline. *Cell* 99, 271-281.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., Sherr, C.J., 1998. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12, 3499-3511.
- Ding, V.M., Boersema, P.J., Foong, L.Y., Preisinger, C., Koh, G., Natarajan, S., Lee, D.Y., Boekhorst, J., Snel, B., Lemeer, S., Heck, A.J., Choo, A., 2011. Tyrosine phosphorylation profiling in FGF-2 stimulated human embryonic stem cells. *PLoS One* 6, e17538.
- Dorresteyn, A.W.C., 1990. Quantitative analysis of cellular differentiation during early embryogenesis of *Platynereis dumerilii*. *Development Genes and Evolution* 199, 14-30.
- Duman, R.S., Voleti, B., 2012. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci* 35, 47-56.
- Eddy, E.M., 1975. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int Rev Cytol* 43, 229-280.
- Emamian, E.S., 2012. AKT/GSK3 signaling pathway and schizophrenia. *Front Mol Neurosci* 5, 33.
- Espinosa, L., Inglés-Esteve, J., Aguilera, C., Bigas, A., 2003. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3  $\beta$  down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. *J Biol Chem* 278, 32227-32235.
- Ewen-Campen, B., Schwager, E.E., Extavour, C.G., 2010. The molecular machinery of germ line specification. *Mol Reprod Dev* 77, 3-18.
- Extavour, C.G., Pang, K., Matus, D.Q., Martindale, M.Q., 2005. vasa and nanos expression patterns in a sea anemone and the evolution of bilaterian germ cell specification mechanisms. *Evol Dev* 7, 201-215.
- Fischer, A.H., Henrich, T., Arendt, D., 2010. The normal development of *Platynereis dumerilii* (Nereididae, Annelida). *Front Zool* 7, 31.
- Frame, S., Cohen, P., 2001. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359, 1-16.
- Garcia-Alonso, J., Ayoola, J.A., Crompton, J., Rebscher, N., Hardege, J.D., 2011. Development and maturation in the nereidid polychaetes *Platynereis dumerilii* and *Nereis succinea* exposed to xenoestrogens. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 154, 196-203.
- García Alonso, J., 2005. Estradiol signalling and oogenesis in *Nereis virens* (Nereididae, Polychaeta). Combined Faculties for Natural Sciences and for Mathematics. Ruperto-Carola University of Heidelberg.

- García-Alonso, J., Hoeger, U., Rebscher, N., 2006. Regulation of vitellogenesis in *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta): effect of estradiol-17 $\beta$  on leucocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 143, 55-61.
- García-Alonso, J., Rebscher, N., 2005. Estradiol signalling in *Nereis virens* reproduction. *Invertebrate Reproduction & Development* 48, 95-100.
- Ge, C., Yu, M., Zhang, C., 2012. G Protein-Coupled Receptor 30 Mediates Estrogen-Induced Proliferation of Primordial Germ Cells Via EGFR/Akt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. *Endocrinology* 153, 3504-3516.
- Gilboa, L., Lehmann, R., 2004. Repression of primordial germ cell differentiation parallels germ line stem cell maintenance. *Curr Biol* 14, 981-986.
- Gobbetti, A., Polzonetti-Magni, A., Zerani, M., Carnevali, O., Botte, V., 1985. Vitellogenin hormonal control in the green frog, *Rana esculenta*. Interplay between estradiol and pituitary hormones. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 82, 855-858.
- Grund, A., 2012. Die Rolle des kanonischen Wnt-Signalweges bei der Entstehung der Urkeimzellen bei *Platynereis dumerilii*, Marburg,.
- Hauenschild, C., Fischer, A., 1969. *Platynereis dumerilii* : mikroskopische Anatomie, Fortpflanzung, Entwicklung. Fischer, Stuttgart.
- Hay, B., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1988. A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* 55, 577-587.
- He, H., Xi, G., Lu, X., 2010. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of an estrogen receptor-related receptor homologue in the cricket, *Teleogryllus emma*. *J Insect Sci* 10, 188.
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87, 905-931.
- Hess, R.A., 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 52.
- Ikenishi, K., Tanaka, T.S., 1997. Involvement of the protein of *Xenopus vasa* homolog (*Xenopus vasa*-like gene 1, *XVLG1*) in the differentiation of primordial germ cells. *Dev Growth Differ* 39, 625-633.
- Johnson, A.D., Crother, B., White, M.E., Patient, R., Bachvarova, R.F., Drum, M., Masi, T., 2003. Regulative germ cell specification in axolotl embryos: a primitive trait conserved in the mammalian lineage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 1371-1379.
- Johnson, L.L., Lomax, D.P., Myers, M.S., Olson, O.P., Sol, S.Y., O'Neill, S.M., West, J., Collier, T.K., 2008. Xenoestrogen exposure and effects in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, WA. *Aquat Toxicol* 88, 29-38.
- Johnstone, S.R., Kroncke, B.M., Straub, A.C., Best, A.K., Dunn, C.A., Mitchell, L.A., Peskova, Y., Nakamoto, R.K., Koval, M., Lo, C.W., Lampe, P.D., Columbus, L., Isakson, B.E., 2012. MAPK phosphorylation of connexin 43 promotes binding of cyclin E and smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 111, 201-211.
- Kadyrova, L.Y., Habara, Y., Lee, T.H., Wharton, R.P., 2007. Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline. *Development* 134, 1519-1527.

- Kalff, A., Spencer, A., 2012. The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies. *Blood Cancer J* 2, e89.
- Keay, J., Bridgham, J.T., Thornton, J.W., 2006. The Octopus vulgaris estrogen receptor is a constitutive transcriptional activator: evolutionary and functional implications. *Endocrinology* 147, 3861-3869.
- Keay, J., Thornton, J.W., 2009. Hormone-activated estrogen receptors in annelid invertebrates: implications for evolution and endocrine disruption. *Endocrinology* 150, 1731-1738.
- Khalturin, K., Anton-Erxleben, F., Milde, S., Plötz, C., Wittlieb, J., Hemmrich, G., Bosch, T.C., 2007. Transgenic stem cells in Hydra reveal an early evolutionary origin for key elements controlling self-renewal and differentiation. *Dev Biol* 309, 32-44.
- Kim, W.Y., Snider, W.D., 2011. Functions of GSK-3 Signaling in Development of the Nervous System. *Front Mol Neurosci* 4, 44.
- Kimura, T., Nakamura, T., Murayama, K., Umehara, H., Yamano, N., Watanabe, S., Taketo, M.M., Nakano, T., 2006. The stabilization of beta-catenin leads to impaired primordial germ cell development via aberrant cell cycle progression. *Dev Biol* 300, 545-553.
- Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U., Ryffel, G.U., 1986. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the Xenopus vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell* 46, 1053-1061.
- Klinge, C.M., 2000. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65, 227-251.
- Klug, A., Schwabe, J.W., 1995. Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J* 9, 597-604.
- Köhler, H.R., Kloas, W., Schirling, M., Lutz, I., Reye, A.L., Langen, J.S., Triebkorn, R., Nagel, R., Schönfelder, G., 2007. Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology* 16, 131-143.
- Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B., Raz, E., 2001. A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev* 15, 2877-2885.
- La Sala, G., Farini, D., De Felici, M., 2010. Rapid estrogen signalling in mouse primordial germ cells. *Exp Cell Res* 316, 1716-1727.
- Lai, F., Singh, A., King, M.L., 2012. Xenopus Nanos1 is required to prevent endoderm gene expression and apoptosis in primordial germ cells. *Development* 139, 1476-1486.
- Lambert, J.D., Nagy, L.M., 2003. The MAPK cascade in equally cleaving spiralian embryos. *Dev Biol* 263, 231-241.
- Lamothe, B., Yamada, M., Schaeper, U., Birchmeier, W., Lax, I., Schlessinger, J., 2004. The docking protein Gab1 is an essential component of an indirect mechanism for fibroblast growth factor stimulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic pathway. *Mol Cell Biol* 24, 5657-5666.
- Lasko, P.F., Ashburner, M., 1988. The product of the Drosophila gene vasa is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335, 611-617.
- Laudet, V., 1997. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19, 207-226.
- Leatherman, J.L., Jongens, T.A., 2003. Transcriptional silencing and translational control: key features of early germline development. *Bioessays* 25, 326-335.

- Leaños-Castañeda, O., Van Der Kraak, G., 2007. Functional characterization of estrogen receptor subtypes, ERalpha and ERbeta, mediating vitellogenin production in the liver of rainbow trout. *Toxicol Appl Pharmacol* 224, 116-125.
- Liang, J., Slingerland, J.M., 2003. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2, 339-345.
- Lidke, A.K., Löwer, A.M., Kollmann, M., Ackermann, C.F., García-Alonso, J., Rebscher, N., In Revision. **17 $\beta$ -Estradiol induces supernumerary primordial germ cells in embryos of the polychaete *Platynereis dumerilii*.**
- Liu, C., He, X., 2010. Destruction of a destructor: a new avenue for cancer therapeutics targeting the Wnt pathway. *J Mol Cell Biol* 2, 70-73.
- Logan, C.Y., Nusse, R., 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810.
- Löwer, A., 2013. Die Rolle des Östrogenrezeptors bei der Keimzellenentwicklung von *Platynereis dumerilii* und deren Disruption durch Xenoöstrogene.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X., 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17, 9-26.
- Maggiolini, M., Picard, D., 2010. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J Endocrinol* 204, 105-114.
- McDevitt, M.A., Glidewell-Kenney, C., Jimenez, M.A., Ahearn, P.C., Weiss, J., Jameson, J.L., Levine, J.E., 2008. New insights into the classical and non-classical actions of estrogen: evidence from estrogen receptor knock-out and knock-in mice. *Mol Cell Endocrinol* 290, 24-30.
- McLaren, A., 2003. Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 262, 1-15.
- Megosh, H.B., Cox, D.N., Campbell, C., Lin, H., 2006. The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination. *Curr Biol* 16, 1884-1894.
- Mendez, R., Richter, J.D., 2001. Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 521-529.
- Moe-Behrens, G.H., Klinger, F.G., Eskild, W., Grotmol, T., Haugen, T.B., De Felici, M., 2003. Akt/PTEN signaling mediates estrogen-dependent proliferation of primordial germ cells in vitro. *Mol Endocrinol* 17, 2630-2638.
- Moriarty, K., Kim, K.H., Bender, J.R., 2006. Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology* 147, 5557-5563.
- Morichika, K., Kataoka, K., Terayama, K., Tazaki, A., Kinoshita, T., Watanabe, K., Mochii, M., 2010. Perturbation of Notch/Suppressor of Hairless pathway disturbs migration of primordial germ cells in *Xenopus* embryo. *Dev Growth Differ* 52, 235-244.
- Notch, E.G., Mayer, G.D., 2011. Efficacy of pharmacological estrogen receptor antagonists in blocking activation of zebrafish estrogen receptors. *Gen Comp Endocrinol* 173, 183-189.
- Nusse, R., Fuerer, C., Ching, W., Harnish, K., Logan, C., Zeng, A., ten Berge, D., Kalani, Y., 2008. Wnt signaling and stem cell control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 59-66.
- O'Donnell, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson, E.R., 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 22, 289-318.

- Ohashi, H., Umeda, N., Hirazawa, N., Ozaki, Y., Miura, C., Miura, T., 2007. Expression of vasa (vas)-related genes in germ cells and specific interference with gene functions by double-stranded RNA in the monogenean, *Neobenedenia girellae*. *Int J Parasitol* 37, 515-523.
- Osada, M., Tawarayama, H., Mori, K., 2004. Estrogen synthesis in relation to gonadal development of Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*: gonadal profile and immunolocalization of P450 aromatase and estrogen. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 139, 123-128.
- Ouyang, X., Xi, G., Bu, C., Wang, H., Zhan, G., Hong, F., 2009. Molecular cloning and expression of an estrogen receptor-related receptor gene in the ant *Polyrhachis vicina* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 102(2), 295-302.
- Ouyang XH, X.G., Bu CP, Wang HL, Zhan GJ, Hong F, 2009. Molecular cloning and expression of an estrogen receptor-related receptor gene in the ant *Polyrhachis vicina* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 102(2), 295-302.
- Petersen, C.P., Reddien, P.W., 2009. Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* 139, 1056-1068.
- Pfaff, D., 1970. Nature of sex hormone effects on rat sex behavior: specificity of effects and individual patterns of response. *J Comp Physiol Psychol* 73, 349-358.
- Raible, F., Tessmar-Raible, K., Osoegawa, K., Wincker, P., Jubin, C., Balavoine, G., Ferrier, D., Benes, V., de Jong, P., Weissenbach, J., Bork, P., Arendt, D., 2005. Vertebrate-type intron-rich genes in the marine annelid *Platynereis dumerilii*. *Science* 310, 1325-1326.
- Raz, E., 2003. Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nat Rev Genet* 4, 690-700.
- Rebscher, N., Lidke, A.K., Ackermann, C.F., 2012. Hidden in the crowd: primordial germ cells and somatic stem cells in the mesodermal posterior growth zone of the polychaete *Platynereis dumerilii* are two distinct cell populations. *Evodevo* 3, 9.
- Rebscher, N., Zelada-González, F., Banisch, T.U., Raible, F., Arendt, D., 2007. Vasa unveils a common origin of germ cells and of somatic stem cells from the posterior growth zone in the polychaete *Platynereis dumerilii*. *Dev Biol* 306, 599-611.
- Resnick, J.L., Ortiz, M., Keller, J.R., Donovan, P.J., 1998. Role of fibroblast growth factors and their receptors in mouse primordial germ cell growth. *Biol Reprod* 59, 1224-1229.
- Roman-Blas, J.A., Castañeda, S., Largo, R., Herrero-Beaumont, G., 2009. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res Ther* 11, 241.
- Saffman, E.E., Lasko, P., 1999. Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell Mol Life Sci* 55, 1141-1163.
- Saito, Y., Vandenheede, J.R., Cohen, P., 1994. The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase 3 in A431 cells. *Biochem J* 303 ( Pt 1), 27-31.
- Sassi, N., Laadhar, L., Driss, M., Kallel-Sellami, M., Sellami, S., Makni, S., 2011. The role of the Notch pathway in healthy and osteoarthritic articular cartilage: from experimental models to ex vivo studies. *Arthritis Res Ther* 13, 208.

- Schneider, S., Steinbeisser, H., Warga, R.M., Hausen, P., 1996. Beta-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mech Dev* 57, 191-198.
- Schneider, S.Q., Bowerman, B., 2007. beta-Catenin asymmetries after all animal/vegetal- oriented cell divisions in *Platynereis dumerilii* embryos mediate binary cell-fate specification. *Dev Cell* 13, 73-86.
- Shimizu, T., Kagawa, T., Inoue, T., Nonaka, A., Takada, S., Aburatani, H., Taga, T., 2008. Stabilized beta-catenin functions through TCF/LEF proteins and the Notch/RBP-Jkappa complex to promote proliferation and suppress differentiation of neural precursor cells. *Mol Cell Biol* 28, 7427-7441.
- Spike, C., Meyer, N., Racen, E., Orsborn, A., Kirchner, J., Kuznicki, K., Yee, C., Bennett, K., Strome, S., 2008. Genetic analysis of the *Caenorhabditis elegans* GLH family of P-granule proteins. *Genetics* 178, 1973-1987.
- Steinmetz, P., 2002. Identifizierung und Funktionsanalyse eines Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptors (FGFR) bei der Entwicklung von *Platynereis dumerilii* (Polychaeta), Fakultät für Biologie. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Subramaniam, K., Seydoux, G., 1999. nos-1 and nos-2, two genes related to *Drosophila* nanos, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 126, 4861-4871.
- Tanaka, S.S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., Noce, T., 2000. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev* 14, 841-853.
- Thornton, J.W., Need, E., Crews, D., 2003. Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science* 301, 1714-1717.
- Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., Saga, Y., 2003. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 301, 1239-1241.
- Varea, O., Arevalo, M.A., Garrido, J.J., Garcia-Segura, L.M., Wandosell, F., Mendez, P., 2010. Interaction of estrogen receptors with insulin-like growth factor-I and Wnt signaling in the nervous system. *Steroids* 75, 565-569.
- Wallen, K., 2005. Hormonal influences on sexually differentiated behavior in nonhuman primates. *Front Neuroendocrinol* 26, 7-26.
- Wang, C., Dickinson, L.K., Lehmann, R., 1994. Genetics of nanos localization in *Drosophila*. *Dev Dyn* 199, 103-115.
- Wang, H., Qian, P.Y., 2010. Involvement of a novel p38 mitogen-activated protein kinase in larval metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans* (Haswell). *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 314, 390-402.
- Watanabe, N., Mii, S., Asai, N., Asai, M., Niimi, K., Ushida, K., Kato, T., Enomoto, A., Ishii, H., Takahashi, M., Murakumo, Y., 2013. The REV7 subunit of DNA polymerase  $\zeta$  is essential for primordial germ cell maintenance in the mouse. *J Biol Chem* 288, 10459-10471.
- Wend, P., Holland, J.D., Ziebold, U., Birchmeier, W., 2010. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 21, 855-863.
- Wilson, E.B., 1892. The cell-lineage of *Nereis*. *A contribution to the cytogeny of the annelid body*. *Journal of Morphology* 6, 361-480.

Wylie, C., 1999. Germ cells. *Cell* 96, 165-174.

Yang, K., Guo, Y., Stacey, W.C., Harwalkar, J., Fretthold, J., Hitomi, M., Stacey, D.W., 2006. Glycogen synthase kinase 3 has a limited role in cell cycle regulation of cyclin D1 levels. *BMC Cell Biol* 7, 33.

Ying, Y., Zhao, G.Q., 2001. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol* 232, 484-492.

Zelada-Gonzales, F., 2005. Germline development in *P. dumerilii* and its connection to embryonic patterning. University of Heidelberg, Heidelberg.

## **6 Anhang**



## 6.1 Abbildungen

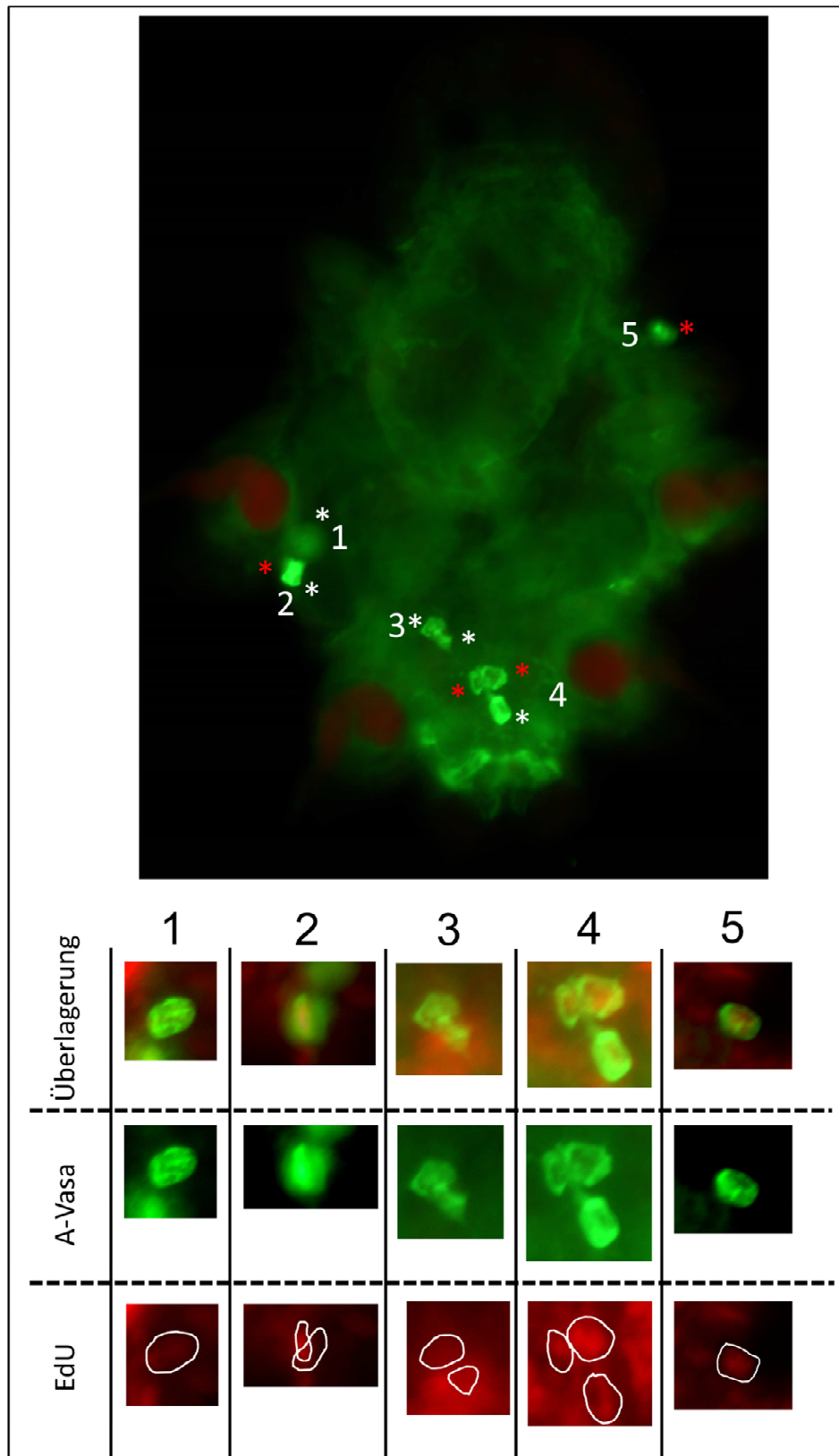


Abbildung 63: Detailansicht der gefärbten Urkeimzellen aus Abbildung 29 D.

## 6.2 Statistik der Estradiolbehandlung

**Tabelle 9: Die Urkeimzellen Anzahl unterscheidet sich signifikant zwischen mit Estradiol behandelten und unbehandelten Tieren.** Anhand eines Kruskal Wallis Test lässt sich ein signifikanter Unterschied (fett gedruckte Daten) zwischen der Kontrollgruppe (DMSO und KSW) und den mit 0,001 µg/ml bis 0,1 µg/ml Estradiol behandelten Tieren nachweisen. (Multiple comparisons of p values (2-tailed); Independent (grouping) variable: treatment; Kruskal-Wallis test:  $H(8, N=1801) = 270.2485$   $p=0.0001$ .) (Lidke et al., In Revision).

	KSW	DMSO	ICI	ICI + 0.1 mg/l	0.1 mg/l	0.05 mg/l	0.01 mg/l	0.001 mg/l	0.0001 mg/l
KSW		1.00	1.00	1.00	<b>6.12 E-8</b>	<b>6.70 E-5</b>	<b>8.22 E-4</b>	0.14	1.00
DMSO	1.00		1.00	1.00	<b>2.51 E-8</b>	<b>3.3 E-5</b>	<b>4.27 E-4</b>	0.09	1.00
ICI	1.00	1.00		1.00	<b>9.99 E-8</b>	<b>1.5 E-5</b>	<b>2.16 E-4</b>	0.05	1.00
ICI + 0.1 mg/l	1.00	1.00	1.00		<b>4.62 E-8</b>	<b>5.2 E-5</b>	<b>5.51 E-4</b>	0.12	1.00
0.1 mg/l	<b>6.12 E-8</b>	<b>2.51 E-8</b>	<b>9.99 E-8</b>	<b>4.62 E-8</b>		1.00	1.00	0.06	<b>9.29 E-4</b>
0.05 mg/l	<b>6.70 E-5</b>	<b>3.30 E-5</b>	<b>1.50 E-5</b>	<b>5.20 E-5</b>	1.00		1.00	1.00	0.11
0.01 mg/l	<b>8.22 E-4</b>	<b>4.27 E-4</b>	<b>2.16 E-4</b>	<b>5.51 E-4</b>	1.00	1.00		1.00	0.55
0.001 mg/l	0.14	0.09	0.05	0.12	0.06	1.00	1.00		1.00
0.0001 mg/l	1.00	1.00	1.00	1.00	<b>9.29 E-4</b>	0.11	0.55	1.00	

## 6.3 Sequenzen

### 6.3.1 *Pdu Vasa* Sequenz aus dem Plasmid ,*Vasa Clon A*'

CGGTGGTGATTCCGGTGGTAACTCCGGAGATTCAAATAGAGGAGATGGCGAAAA  
GAAAAGTGAATCTATGTTCCCCCGCCTCCCCCGGAGAGTGAAGAAGAAATGTTCC  
CAGTCCATCACAGCCGGAATCAACTTTGACAAATACGAGTCTATTCTGTTGAAGT  
GTCAGGCACTAATGCACCAAAGAACGGCATTTTAAATTTTGATCAAGCAGACCTAT  
CGGAAAGTGTCCGCTCCAATGTACGTAAAGCCAAGTACGATCGGCCGACCCCTAT  
CCAGAAGTGGGCTATCCCTATCGTCCTCTCAGGCAAAGACTTGATGGGCTGTGCT  
CAAACAGGATCCGGAAAAACAGCTGCTTTCTTGCTACCCGTGCTGACTGGAATTA  
TCAAGAATGATCTCATCGAAGGAGGTTCTGGTTTTGGAGGACCCCAATACCCTGC  
CGCTATTATCGTTGGACCCACCAGAGAGTTGGTCAACCAGATCTATCTCGAAGCA  
AGGAAGTTTGCTTCTTCAACTTGCGTCAGACCAGTCGTCGTTTACGGTGGAACTTC  
AGTTGGATACCAAGCCAGAGAACTGGAGAAGGGCGCCACGTTGTCGTTGGTAC  
CCCCGGTCGATTGCTCGACTTCATTGGAAAGGGCAAGATTAAGTTGTCGAAGGTG  
AAGTACCTCATCCTGGATGAAGCCGATCGTATGTTGGACATGGGTTTCGAGCCCG  
AGATCAGAAAGCTCGTCACAACCTTCGATATGCCCGAGAAAGGCCAGAGACAGAC  
CCTCATGTTGAGCGCAACCTTCGCTGCCGAGATCCAGCAGCTTGCCAAGGAGTTC  
TTGAGCGAGTATGTGTTTGTGACTGTCGGACGAGTGGGTGGTGCCAACTCCGACA  
TACTCAGGAAGTCCACCAAGTCACCAAGTACGAGAAGAGGGAGAAGCTCGTGG  
AGATCTTGAACCAAGCAGGAACCGACAGAACCCTGGTATTCCTGGAAACCAAGCG  
CAGTGCTGAATTTCTTGCTGCGTATCTGTCCAGGAACAGTACCCTGCCACAAGT  
ATTCACGGAGATCGTTTGCAGAGGGAAAGAGAAGAGGCCTTGTTGGACTTCAAAA  
CAGGCCGAGCTCCGATCTTGATTGCTACCTCGGTGGCTGCCAGAGGTCTTGATAT  
TCCTGGCGTCAAGCACGTCATAAACTACGATCTCCCCAGTGGCATTGATGAGTAC  
GTCCACAGAATTGGTCGAACCGGTCGTTGCGGTAATCTTGGAAGGCCACATCAT  
TCTTCGATCCGGATGTTAACCAAGACAAAGAACTTGCTCGATCCCTCGTCAAACT  
CTCGGCGACGCACAACAAGTTGTCCCACCATGGCTTGAGGAGATCGCGGAGGGA  
GCCATTTCTAGTGGATTCCAGGGAGGCGACAGATTTGGCGCCAAGGACACCCGT  
AGAGGAATGAGGAAAACACAGAAGATGCTGGATTGCGCGGAAGTTCCAATGGAT  
TCGGAGGCGATGCTGGCGGTGGTGATGACGAGGACTGGGATTAATCTCCAGAC  
AAACCAAGTAGATTAATGCTTGAAGTTGTAATTGCGCTCTTTGGTTCAATTAATCCC  
ATTCTTTTAAGTAGTTCTTTTGTAGCCAGCTGGGCTGGACCAGTTTCTGAAACCA  
TCTTGATTCTTGCTAGTAGAGTACAATGATTGTACCGGATGTGCTATTATTCTCTT  
TGGTGCTAAACGGTGCCCTATGTAGAAGTGTACAGTTGGTTAAAGAGAAAGTTGCG

AGTGACCTACAACATGTGTAAATTTAGATTATGTATCTCAATGAAATGTTTTTGAAT  
GTTATGTATAATATGAGTCACTTGCGGCATGTTGGCTAACATTGTTAGATTTTATCA  
GTTGTAACCGCATTATTTTAGCTCTATAGCTTTGTATATCTCATTTAATCATGTAA  
TTTCTAGTTTTCTTGACGTTAAACATATATGCAGCTGTAATCAACCATTCAAGTATG  
AATCGACTGTCGGAAATTATGGACTAGGAAAGAAAATGCTCATTTATGTCGCTAAT  
TGAGAGTAGCTGGTCTCTTCTCATCCACGTTATTAAGACACGGAGTCAGTGACTT  
GAGTGGTAGGTTACGGTCTTATATGCAGACTTTTACCTCGGAACATCTTGCCTTGC  
ATTTTCATGAATGAAGGGCGCTTGTTCTAAAGTGCCTTTCTGATAACCTCAAGCTGC  
TTCCCCATTCCATTTTAAATCTCATCTTTCTGTACATTTGACACGCTGGTTCATGTAA  
AGATTTCTTATGTAAATATCTCCATACCGAATTCTGTTTTAGGCGGGAGGTTAAAG  
CCATTATTATGTACATATGTGTCGCCATTCAAGGTTGGACTAATTGTCTTCAATTTT  
ACAATTGTTTCTCCGTGTAAAGATAAGCAATCCGTCCGTTTATTGTTTATTCTCCCT  
CCTACAGTAGCTAGTCTTGCTCAATTTTTCACAAACATATGTGTTTCATCTTCTTCAT  
TCCGTACATCAAGTAACTAGTTTGATGTGTTGGAATTAAATGATTTACTCAGGTAGT  
CTTTGATTTTGATAACTTTATATATAAATGAAATATTTGCTAGCCGTTGATTCGTGAT  
CAAATGAAGTCCTTTTGCTACTGATTACGTGTGATCGTTTAAAGTGCCTGAACTAGT  
GTAGTCTGATCTCATTCCATGGAAAGTTATATTGCGTAGTTTTATCTTTATCAAGGA  
ATTCCAGATCCGTCCTTGGGTTGGAAAGAACCCTGACTGTAAGAGGCAGCCGG  
AAGAAGGCTGTAATGTCTCTTCAGATGTTAGGGCGTTGTACAGCTGATACTTAAAA  
TACTCTTCGGGGAAAGTGTACTTAGAATTTTGAAGTTAAGTGGAACATAGAAACGA  
AAGTTCATTAGATATTTTCAGATGTTTCATATCAACTGGATTTGTGGCATGTCTAGGAT  
ATTCTACAGGGAGTTTAAAGTGTAACTCTGGTGCTGATGGGGCGGGCGTAAACACA  
AACTCGCTCGAGTGTAATCTGTGCTACGCCTCTGTTCTGCAGCTCTCCAGTTGTCT  
CTATCAGTACTGGGGGCTTTCTTGGAAATTGCTCTGTGGTTAATCTGTTGTCCGT  
TATGTGTTAGTGATACATCTTAAATGCCAAAAGGAAATCTGAGGTAAACTTGT  
AATTGCACTCTCCAGATATTGGGTGGAGGCACTCTCCATAGATTGGGTGGATACC  
CTTTCTAGATACTTGAATTTACCTTTGATCTCGTGGAAAGAAAACCTGGTGATGC  
TGTTGTCTGTATGGTTTACTTCGGTGACTTGATGCAGAGTTGGGATTCATAGTCTT  
CTGTTTGGTCTGGGTTTATGAAAGAATAGTCGAAGTAAGAAAACAGAACACTGACG  
GGATACATGCCAAGTGCAAGTTGATCGACTAACAAGTAAAGGTGCTAAGTAGCAG  
GAGAAGCAGCAGCCAGTTGTGCAAATTGAGGAAAATGCAGGTTAATGTTTAATACT  
CACTTGGCCTGCATGCAAGGGTGCCTGAAGTTGGCTCTGCACTTGTCCATTATTG  
CGTCTCGTACTGTTTTGTTAGGTGATTCCACTCTCCAGTTGTCTCGTTAGGACTCT  
TCAGTCCCATTAATAAGTGACGCAATAATGGATAGGTGTAATCCGCTTAGTTGAA  
GGGCAAAATGAGGAATGATTTCCGGCAAGAGATTTGCGCACAGGGTAATTGAAATG

AAATTGGTGGGTGGGCATTTTGTTACTTCGGTTGGGTGGTATTCTCCTCAGTTTGC  
CCTGAGAGATCCTTGCATGTCTGGACCAAGGAAATGTCAC TTGAATTAAGGTGCT  
GTGGATGAAATTCAAACCACCAGTCTTTCTTTCTTAGCTTTATCATTGCAATCGATA  
CGTATCCAGATTGCCAAAGAGCAGCAGTATTAGATGAAACATGTTAGAAAGATATT  
TTGACGTCAACCGGTCATGTTGAGTTTGTATGCGAGAATCTTTTAGTTCTAGTCGC  
AAGGTCAACAGTTGATTACATTGATCTGAATAAAAGATAAATTGCGTTTTTCAGGTA  
AAATC**AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**

6.3.2 Sequenzvergleich *Aktin*.

		*	460	*	480	
Pd-actin	:	-----		-----		-
Lumbricus	:	-----	TTCGTAGTCGTCTTCATCTTTCTCTTTGTTAT			32
Aplysia	:	-----	-----	ACGAACTTTGTTCACTTTCC		20
Spurpuratu	:		TTGCAGACATGTTAATTAACGATGTTTATTTTGTGTG			481
Haliotis	:	-----		-----		-

		*	500	*	5	
Pd-actin	:	---	GATTCAAGCC--TCAGCAACTTAAACATCCAAA			32
Lumbricus	:		TTTTCCCTCGTCCGTTTGAGGCTTTG--CAGTCAGAA			67
Aplysia	:		AACCTTCCAGGTCCGTTACTCACACACAAACTCAATA			57
Spurpuratu	:		TGTCTTCATAGTAAATAAAATCAGAAATCAATCATCA			518
Haliotis	:	-----	-----	ACCTACAGCCA		11

A

		20	*	540	*	
Pd-actin	:	TGTGCGACGACGACGACGTTGCTGCTCTCGTAGTG		GACAA		69
Lumbricus	:	TGTGCGACGAAGAGGTTACCGCTTTGGTTGTC		GACAA		104
Aplysia	:	TGTGCGACGACGACGACGTTGCTGCTCTTGTGTGTG		GACAA		94
Spurpuratu	:	TGTGTGACGACGATGTTGCCGCTCTTGTTCATC		GACAA		555
Haliotis	:	TG--GATGATGATGTTGCTGCATTGGTCTGT		GACAA		45

TG    GA   GA   GA   GTT   C   GC   T   GT    GACAA

		560	*	580	*	
Pd-actin	:	TGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGTTTCGCCGGAGAC				106
Lumbricus	:	TGGATCCGGTATGTGCAAGGCCGGCTTCGCCGGCGAC				141
Aplysia	:	TGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGCTTCGCCGGTGAC				131
Spurpuratu	:	CGGATCCGGTATGGTGAAGGCCGGATTTCGCCGGAGAC				592
Haliotis	:	CGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGTTTCGCCGGTGAC				82

GG   TCCGG   ATG    AA   GCCGG   TTCGCCGG   GAC

		600	*	620	
Pd-actin	:	GATGCTCCAGAGCTGTCTTCCCCTCCATCGTCGGCC			143
Lumbricus	:	GATGCCCCAGGGCCGTCTTCCCCTCCATCGTCGGAC			178
Aplysia	:	GACGCTCCAGGGCCGTCTTCCCCTCCATCGTCGGAC			168
Spurpuratu	:	GATGCCCAAGGGCCGTCTTCCCCTCCATCGTTGGCA			629
Haliotis	:	GATGCTCCAGAGCTGTCTTCCCCTCCATCGTCGGAC			119

GA   GC   CC   AG   GC   GTCTTCCC   TC   ATCGT   GG

		*	640	*	660	
Pd-actin	:	GCCCCCGTCATCAGGGTGT		CATGGTCGGTATGGGTCA		180
Lumbricus	:	GCCCCCGTCATCAGGGTGT		CATGGTCGGTATGGGTCA		215
Aplysia	:	GCCCCAGGCATCAGGGTGT		CATGGTTGGTATGGGCCA		205
Spurpuratu	:	GACCCCGTCATCAGGGTGT		CATGGTCGGTATGGGACA		666
Haliotis	:	GTCCCAGACATCAGGGCGT		CATGGTCGGTATGGGTCA		156

G   CCC   G   CATCAGGG   GT   ATGGT   GGTATGGG   CA

		*	680	*	700	
Pd-actin	:	GAAGGACAGCTAC	GTCTGGCGATGAGGCC	CAGAGCAAG	:	217
Lumbricus	:	GAAGGACAGCTAT	GTGGGTGATGAGGCC	CAGAGCAAG	:	252
Aplysia	:	GAAGGACAGCTAC	GTCTGGTGATGAGGCT	CAGTCCAAG	:	242
Spurpuratu	:	GAAGGACAGCTAC	GTCTGGAGACGAGGCC	CAGAGCAAG	:	703
Haliotis	:	GAAAGACAGCTAC	GTGGGAGATGAGGCT	CAGTCCAAG	:	193
		GAA GACAGCTA	GT GG GA GAGGC	CAG CAAG		
		*	720	*	740	
Pd-actin	:	AGAGGTATC	CTCACACTG	AAGTACCCCATC	GAGCAGC	: 254
Lumbricus	:	AGAGGTATT	CTCACCTG	AAGTACCCCAT	TGAGCAGC	: 289
Aplysia	:	AGAGGTATC	CTCACCTG	AAGTACCCCATC	GAGCAGC	: 279
Spurpuratu	:	AGAGGTATC	CTCACCTG	AAGTACCCCATC	GAGCAGC	: 740
Haliotis	:	AGAGGTATC	CTCACCTC	AAGTACCCCATC	GAGCAGC	: 230
		AGAGGTAT	CTCAC CT	AAGTACCCCAT	GAGCAGC	
		*	760	*		
Pd-actin	:	GAATCGTCAC	CAACTGGGAC	GACATGGAGAAGATCTG	:	291
Lumbricus	:	GTATCGTCACA	AACTGGGAC	GATATGGAGAAGATCTG	:	326
Aplysia	:	GCATCGTCAC	CAACTGGGAT	GACATGGAGAAGATCTG	:	316
Spurpuratu	:	GTATCGTCAC	CAACTGGGAC	GATATGGAGAAGATCTG	:	777
Haliotis	:	GTATCGTCAC	CAACTGGGA	GACATGGAGAAGATCTG	:	267
		G ATCGTCAC	AACTGGGA	GA ATGGAGAAGATCTG		
		780	*	800	*	
Pd-actin	:	GCATCACACCTTCTACAAT	GAATTGAGAGTTAACTCT	:	328	
Lumbricus	:	GCATCACACCTTCTACAAC	GAGCTGCGTGTT--GCCC	:	361	
Aplysia	:	GCATCACACCTTCTACAAT	GAGCTGCGTGTT--CCCC	:	351	
Spurpuratu	:	GCATCACACCTTCTACAAC	GAACTCCGTGTT--GCCC	:	812	
Haliotis	:	GCATCACACCTTCTACAAC	GAGCTCCGCGTT--GCAC	:	302	
		GCATCACACCTTCTACAA	GA T G GTT			
		820	*	840	*	
Pd-actin	:	CAATTCAATTGTAGAAAGGTGTTATGTT	GGAATTTACCC	:	365	
Lumbricus	:	CAGAGGAGCACCCAGTCCTGCTGACC	GAGGCTCC--CC	:	397	
Aplysia	:	CAGAGGAGCACCCCGTCCTGCTCACT	GAGGCCCC--CC	:	387	
Spurpuratu	:	CAGAGGAGCACCCCGTCCTCCTTACC	GAGGCTCC--CC	:	848	
Haliotis	:	CAGAGGAGCACCCCGTCCTCCTGACAG	GAGGCTCC--CC	:	338	
		CA A	G C CC			
		860	*	880		
Pd-actin	:	TTGGCCGACCAATCACTAGT	-----	:	385	
Lumbricus	:	TCAACCCCAAGGC	CAACAGGGAAAAGATGACCCAG--	:	432	
Aplysia	:	TCAACCCCAAGGC	CAACAGAGAGAAGATGACCCAG--	:	422	
Spurpuratu	:	TCAACCCCAAGGC	CAACAGGGAAAAGATGACACAGGT	:	885	
Haliotis	:	TCAACCCCAAGGC	CAACCGTGAAAAGATGACCCAG--	:	373	
		T CC	CA G			

Abbildung 64: Kompletter Sequenzvergleich verschiedener Aktin Sequenzen.

6.3.3 Sequenzvergleich *PduCyclinB1*

```

          *           20           *           40
B1 : ----- : -
2  : --TTTTTCTGAC-ATTCAGCTCCGGCAGTCATGGCGGCCGCGGA : 42

          *           60           *           80           *
B1 : -----GTTTGAAGGAGGCTGTGTTGAAGGCCAGGCCAAACCT : 37
2  : ATTCGATTGTTTGAATAAGGCTGTGTTGAAGGCCAGGCCAAACCT : 87
      GTTTGAA AGGCTGTGTTGAAGGCCAGGCCAAACCT

          100           *           120           *
B1 : GTCCAAATCAACTGGCACCACCTTCATTGAAGTCTGTGGTCGACAA : 82
2  : GTCCAAAACAAGTGGCACCACCTTCATTGAAGTCTGTGGTCGACAA : 132
      GTCCAAA CAAGTGGCACCACCTTCATTGAAGTCTGTGGTCGACAA

          140           *           160           *           180
B1 : AGAGAATCCTGTTGCTGCCCCAGAACTGGCAAATCAAGGAAGA : 127
2  : AGAGAATCCTGTTGCTGCCCCAGAACTGGCAAATCAAGGAAGA : 177
      AGAGAATCCTGTTGCTGCCCCAGAAAC*****

          *           200           *           220
B1 : AGCTATCAAGGATGAGCTCAGAAAATTGGACGTTTGCAAGGAGGT : 172
2  : AGCTATCAAGGATGAGCTCAGAAAATTGGACGTTTGCAAGGAGGT : 222
      *****

          *           240           *           260           *
B1 : CGCGTCTCCCATGGACACCTCAAGCCAGCAGATTGAAGCCTACTC : 217
2  : CGCGTCTCCCATGGACACCTCAAGCCAGCAGATTGAAGCCTACTC : 267
      *****

          280           *           300           *
B1 : CAAGCAACTGCTGCCGACAATGTTGCCAACATCGACAAAGATGA : 262
2  : CAAGCAACTGCTGCCGACAATGTTGCCAACATCGACAAAGATGA : 312
      *****

          320           *           340           *           360
B1 : CACTGAGAATCCCCAACTTGTGTCAGCGAGTACGTCAATGACATCTA : 307
2  : CACTGAGAATCCCCAACTTGTGTCAGCGAGTACGTCAATGACATCTA : 357
      *****

          *           380           *           400
B1 : TGA CTACATGTACGAGTTAGAGAGGAAATACAACATCAAGACCAA : 352
2  : TGA CTACATGTACGAGTTAGAGAGGAAATACAACATCAAGACCAA : 402
      *****

          *           420           *           440           *
B1 : GTATTTGGAGGGGCAAGAAATCAACGGGCGCATGAGGGCCATCTT : 397
2  : GTATTTGGAGGGGCAAGAAATCAACGGGCGCATGAGGGCCATCTT : 447
      *****

```



```

          460          *          480          *
B1 : GTACGACTGGCTGGTCCAGGTCCATCTCAGGTTCCACTTGCTCCA : 442
2 : GTACGACTGGCTGGTCCAGGTCCATCTCAGGTTCCACTTGCTCCA : 492
   *****

          500          *          520          *          540
B1 : AGAGACCCTCTACTTGACCACATCCATCATTGATCGCTTTTTTGCA : 487
2 : AGAGACCCTCTACTTGACCACATCCATCATTGATCGCTTTTTTGCA : 537
   *****

          *          560          *          580
B1 : GATCCAGACAGTGTCCAAGAACAACACTGCAGTTGGTGGGAGTGAC : 532
2 : GATCCAGACAGTGTCCAAGAACAACACTGCAGTTGGTGGGAGTGAC : 582
   *****

          *          600          *          620          *
B1 : TGCCATGTTGATTGCCTCTAAATATGAAGAGATGTACGCCCCAGA : 577
2 : TGCCATGTTGATTGCCTCTAAATATGAAGAGATGTACGCCCCAGA : 627
   *****

          640          *          660          *
B1 : AATTGCCGACTTTGTCTACATCACGGACAACGCCTACTCCAACGG : 622
2 : AATTGCCGACTTTGTCTACATCACAGACAACGCCTACTCCAAGGC : 672
   *****

          680          *          700          *          720
B1 : CGACATCAGGCGCATGGAGAGTGTGCATCCTGAAAACCTTGGAATT : 667
2 : GGACATCAGGCGCATGGAGGTTTGCATCCTGAGAACTCTGGAATT : 717
   *****

          *          740          *          760
B1 : TCACCTTGCCCGACC----- : 682
2 : TCACCTTGCCCGACCAATCACTAGTGAATTTCGCGGCCGCCTGCAG : 762
   *****

```

**Abbildung 65: Kompletter Sequenzvergleich der CyclinB Sequenzen.** Bei Sequenz ‚B1‘ handelt es sich um die *PduCyclinB1* Sequenz (GenBank: HE858370.1) , Sequenz ‚2‘ ist die Sequenz des klonierten PCR Produktes (siehe 3.7.3).

## 6.4 Vektorkarten

### 6.4.1 pGEM-T Easy Vektor

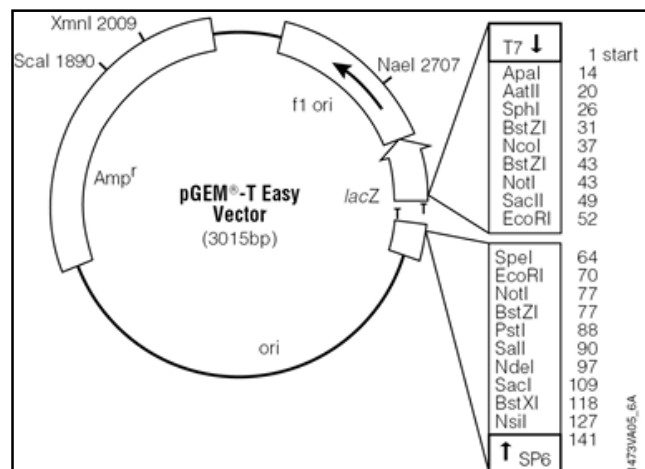


Abbildung 66: Vektorkarte des Vektors pGEM-T Easy

*PduCyclinB1* ist in die ‚Multi Cloningsite‘ in den durch EcoRV linearisierten Vektor einkloniert.

*PduAktin* ist in die ‚Multi Cloningsite‘ in den durch EcoRV linearisierten Vektor einkloniert.

### 6.4.2 pcDNA3 Vektor

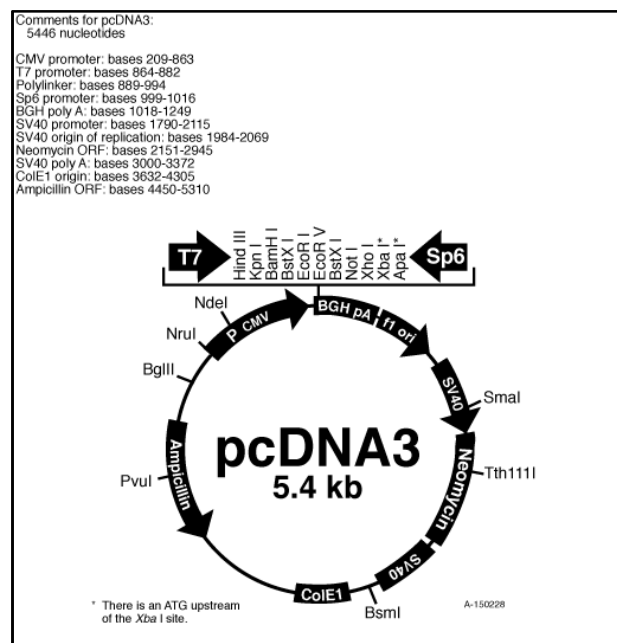


Abbildung 67: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.

*PduER* ist zwischen zwischen BamHI und EcoRI kloniert.

### 6.4.3 pCMV Sport6 Vektor

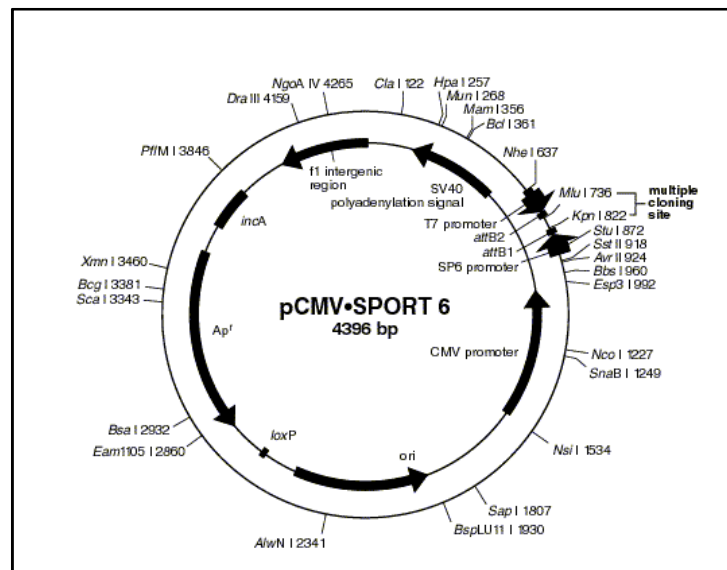


Abbildung 68: Vektorkarte des Vektors pCMV Sport 6.

*PduVasa* ist in der ‚multiple cloning site‘ einkloniert.

## 6.5 Abkürzungen

AKT	Proteinkinase B
Azp	Azakenpaullon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-A/C/T/G-Triphosphat
ECL	enhanced chemiluminescence
ER	Estradiolrezeptor
ERE	Estradiol Response Element
Estradiol	17- $\alpha$ -Estradiol
Ethinylestradiol	17- $\beta$ -Ethinylestradiol
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
g	Gramm
GSK3 $\beta$	Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$
h	Stunde
ICI	ICI182 780
ISH	In Situ Hybridisierung
KLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
KSW	künstliches Seewasser
l	Liter
M	Mol
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
min	Minute
NRE	Nanos Response Element
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
U	Unit
UKZ	Urkeimzelle
UTR	Untranslatierte Region

## 6.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Unreife und geschlechtsreife Tiere lassen sich gut voneinander unterscheiden.....	6
Abbildung 2: Markante Zeitpunkte in der Entwicklung der Urkeimzellen bei <i>Platynereis</i> .....	7
Abbildung 3: Die Entwicklung der Gameten in <i>Platynereis dumerilii</i> . 8	
Abbildung 4: Bei der Entstehung der Urkeimzellen liegt eine assymetrische Verteilung von $\beta$ -Catenin vor.....	9
Abbildung 5: Das Zusammenspiel von GSK3 $\beta$ , AKT und $\beta$ -Catenin. Verändert nach (Duman and Voleti, 2012).....	10
Abbildung 6: AKT kann durch viele verschiedene Rezeptoren aktiviert werden. Verändert nach (Emamian, 2012).....	11
Abbildung 7: Der FGFR kann verschiedene Signalwege aktivieren. ....	12
Abbildung 8: Der MAPK Signalweg wird durch den Inhibitor UO126 unterbrochen.....	14
Abbildung 9: Der $\gamma$ -Sekretase Inhibitor DAPT verhindert das Abtrennen der Intrazellulären Domäne von Notch.. ....	15
Abbildung 10: Der Estradiolrezeptor kann verschiedene Signalwege aktivieren.....	16
Abbildung 11: Schematische Darstellung eines ER-Dimers an einem ERE.....	17
Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Northern Blots.....	34
Abbildung 13: Aufbau für den Proteintransfer (Biorad) .....	39
Abbildung 14: Die aufgetrennten Proteine lassen sich durch UV-Licht nachweisen.....	39
Abbildung 15: Die Lösungsmittel Ethanol und DMSO bewirken keine morphologischen Veränderungen in der Entwicklung der Larven.....	45
Abbildung 16: Die Behandlung mit Estradiol führt zu überzähligen Urkeimzellen, Ethanol ist dabei als Lösungsmittel ungeeignet.....	44
Abbildung 17: Zeiträume der Estradiol und Ethinylestradiol Behandlung in Relation zu wichtigen Schritten in der Entwicklung von <i>P. dumerilii</i> . ....	46
Abbildung 18: Die Inkubation mit Estradiol von 2 h bis 24 h führt zu überzähligen Urkeimzellen. ....	47

Abbildung 19: Während der Entstehung der Urkeimzellen liegt ein sensibler Zeitraum für die Behandlung mit Estradiol.....	48
Abbildung 20: Behandlungsschema für die Eingrenzung des sensiblen Zeitraums.....	49
Abbildung 21: Der sensitive Zeitraum für eine Estradiol Behandlung lässt sich auf 4 h bis 9 h eingrenzen.....	51
Abbildung 22: Die Auswirkungen von Estradiol auf die Urkeimzellen Entwicklung lassen sich durch den ER Inhibitor ICI hemmen.. .....	52
Abbildung 23: Mit dem ER Antikörper von St. Cruz lässt sich keine spezifische Bande detektieren.. .....	53
Abbildung 24: Bei dem ER Antikörper von Sigma lässt sich keine Bande der erwarteten Größe detektieren. ....	53
Abbildung 25: Der ER Antikörper von Novatain detektiert keine Bande der erwarteten Größe.....	54
Abbildung 26: Herstellung der Estradiolrezeptor Sonde.. .....	55
Abbildung 27: Estradiolrezeptor mRNA lässt sich in einem 6 h alten Embryo in den Mikromeren nachweisen.....	55
Abbildung 28: Inkubationszeiträume mit dem Proliferationsmarker EdU.....	56
Abbildung 29: Nach einer Behandlung mit E2 entstehen noch nach 8 Std Urkeimzellen.. .....	57
Abbildung 30: Inkubation mit den Proliferationsmarkern EdU und BrdU.. .....	58
Abbildung 31:Auf Transkript Ebene ließ sich kein Unterschied zwischen mit Estradiol behandelten und unbehandelten Embryonen aufzeigen.....	59
Abbildung 32: Ethinylestradiol erzeugt überzählige Urkeimzellen. ....	60
Abbildung 33: Eine Inkubation zwischen 2 h und 24 h erzeugt überzählige Urkeimzellen. ....	61
Abbildung 34: Inkubation mit Estradiol und dem AKT-Inhibitor. Behandlung .....	62
Abbildung 35: Der AKT Inhibitor führt zu einer Veränderung der Anzahl der Urkeimzellen. ....	63
Abbildung 36: Azakenpaullon erzeugt einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Morphologie der Larven.....	64

Abbildung 37: Behandlungszeiträume mit dem GSK3 $\beta$ Inhibitor Azakenpaullon.....	65
Abbildung 38: Azakenpaullone verändert die Anzahl der Urkeimzellen abhängig von der eingesetzten Konzentration.. .....	66
Abbildung 39: Eine Behandlung mit Azakenpaullon führt von 5,5 h bis 6,5 h zu einer erhöhten Urkeimzellen Anzahl.....	67
Abbildung 40: Eine Inkubation mit Azp von 3 T bis 4 T zeigt keine Auswirkung auf die Urkeimzellen. Sowohl in der Kontrolle .....	68
Abbildung 41: $\beta$ -Catenin lässt sich in 10 h alten Embryonen anfärben. ....	69
Abbildung 42: Inkubationszeiträume mit dem FGFR Inhibitor SU5402. ....	70
Abbildung 43: SU5402 erzielt keinen Effekt auf die Urkeimzellen Anzahl. ....	71
Abbildung 44: Behandlung mit dem MAPK Inhibitor UO126 und Estradiol.....	72
Abbildung 45: Der Inhibitor UO126 zeigt keine Auswirkung auf die Anzahl der Urkeimzellen.....	73
Abbildung 46: Inkubationszeiträume mit dem $\gamma$ -Sekretase Inhibitor DAPT. ....	75
Abbildung 47: Eine Behandlung mit DAPT hat keine Auswirkungen auf die Urkeimzellen Entwicklung.....	76
Abbildung 48: Im 3'UTR der Sequenz des PduFGFR befindet sich sehr wahrscheinlich ein Nre. ....	77
Abbildung 49: Der Verdau des Vektors Vasa ClonA mit verschiedenen Enzymen erzeugte nicht die erwarteten Fragmente. ....	79
Abbildung 50: Restriktionskarte des Vektors ‚Vase ClonA‘. ....	79
Abbildung 51 Ausschnitt des Sequenzvergleichs <i>Aktin</i> Sequenzen.....	81
Abbildung 52: Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich. ....	81
Abbildung 53: $\alpha$ -Tubulin lässt sich in <i>Platynereis dumerilii</i> Embryonen anfärben.....	82
Abbildung 54: Weder mit einer Kernfärbung noch einer EdU/H3K4 Färbung lassen sich die Urkeimzellen gut sichtbar machen.....	83
Abbildung 55: Der Einsatz des H3K4 Antikörpers zusammen mit einer EdU Färbung macht die Urkeimzellen in einem 10 h alten Embryo nicht sichtbar.. ....	83
Abbildung 56: Zeitfenster für eine Behandlung mit Estradiol.....	87

---

Abbildung 57: Schematische Darstellung der Regulation des Zellzyklus. ....	88
Abbildung 58: Schematische Darstellung der Urkeimzellen Proliferation. ....	89
Abbildung 59: Schematische Darstellung der Wirkung des Tankyrase Inhibitors XAV939. ....	91
Abbildung 60: Modelle für die ablaufenden Signalwege bei der Entstehung der Urkeimzellen	92
Abbildung 61: Die Translation des FGFR könnte durch Nanos reguliert werden. ....	93
Abbildung 62 Schematische Darstellung des Zellzyklus und der daran beteiligten Cycline. ....	93
Abbildung 63: Detailansicht der gefärbten Urkeimzellen aus Abbildung 29 D. ....	109
Abbildung 64: Kompletter Sequenzvergleich verschiedener Aktin Sequenzen. ....	115
Abbildung 65: Kompletter Sequenzvergleich der CyclinB Sequenzen. ....	117
Abbildung 66: Vektorkarte des Vektors pGEM-T Easy .....	118
Abbildung 67: Vektorkarte des Vektors pcDNA3. ....	118
Abbildung 68: Vektorkarte des Vektors pCMV Sport 6. ....	119



## 6.7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer .....	26
Tabelle 2: Zusammensetzung einzelner PCR Reaktionen.....	29
Tabelle 3: Verwendete PCR Programme.....	30
Tabelle 4: Pipetierschema Restriktionsverdau.....	32
Tabelle 5: Pipetierschema Sequenzierung .....	32
Tabelle 6: Pipetierschema für die Sondensynthese .....	33
Tabelle 7: Pipetierschema Probenvorbereitung Northern Blot .....	34
Tabelle 8: Für die Sequenzanalyse verwendete Aktin Sequenzen .....	80
Tabelle 9: Die Urkeimzellen Anzahl unterscheidet sich signifikant zwischen mit Estradiol behandelten und unbehandelten Tieren. ....	110

## 6.8 Tagungen und Veröffentlichungen

### 2010

#### **International Conference on Invertebrate Reproduction and Development in the Age of Genetic Modifications**

Prag, 16. - 20. August

Poster: "Identification of molecular mechanisms of germ cell specification in the polychaete *Platynereis dumerilii*"

#### **103. DZG Jahrestagung 2010**

Hamburg, 17. - 21. September

Poster: "Identification of molecular mechanisms of germ cell specification in the polychaete *Platynereis dumerilii*"

#### **Mechanisms, functions and evolution of Wnt signaling pathways**

#### **Wnt-Symposium, DFG Forschergruppe 1036**

Heidelberg, 25. - 26. Oktober

Poster: "Identification of molecular mechanisms of germ cell specification in the polychaete *Platynereis dumerilii*"

### 2011

#### **Joint Meeting der deutschen und japanischen Gesellschaft für Entwicklungsbiologie**

Dresden, 23. - 26. März

Poster: "Identification of molecular mechanisms of germ cell specification in the polychaete *Platynereis dumerilii*"

### 2012

#### **Emergence and evolution of developmental patterns - cnrs**

Roscoff (Brittany) France, 25. - 29. April

Poster: "Estradiol promoted effects on the development of primordial germ cells in the polychaete *Platynereis dumerilii*"

**105. DZG Jahrestagung 2012**

Konstanz, 21. - 24. September

Talk: "Estradiol promoted effects on the development of primordial germ cells in the polychaete *Platynereis dumerilii*"

Rebscher, N., **Lidke, A.K.**, Ackermann, C.F., 2012. Hidden in the crowd: primordial germ cells and somatic stem cells in the mesodermal posterior growth zone of the polychaete *Platynereis dumerilii* are two distinct cell populations. *Evodevo* 3, 9.

**2013**

**Lidke, A.K.**, Löwer, AM, Kollmann, M, Ackermann, CF, García-Alonso, J , Rebscher, N, in Revision. 17 $\beta$ -Estradiol induces supernumerary primordial germ cells in embryos of the polychaete *Platynereis dumerilii* ; Eingereicht in 'General and Comparative Endocrinology'

## 6.9 Wissenschaftlicher Werdegang

- 10/2002 – 11/2007 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum mit dem Abschluß Diplom Biologin
- 09/2006 – 11/2006 Forschungsaufenthalt an der Tokyo University, Tokyo, Japan, bei Professor Dr. Masahiko Ikeuchi
- 02/2008 – 12/2009 Praktikantin im Universitätsklinikum Marburg bei Professor Dr. David Jones
- 01/2010 – 12/2012 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Philipps Universität Marburg in der speziellen Zoologie bei Dr. Nicole Rebscher.
- 01/2010 – Aktuell Promotion an der Philipps Universität Marburg in der speziellen Zoologie bei Dr. Nicole Rebscher

## 6.10 Danksagung

Zuerst möchte ich Dr. Nicole Rebscher meinen Dank für viele Dinge aussprechen. Dafür dass sie mir dieses spannende Thema überlassen hat und die Betreuung dieser Arbeit. Vielen Dank für jeden Rat, jede Ermutigung, jede Diskussion und jeden Moment Spaß. Es waren großartige 3 ½ Jahre, die mich wissenschaftlich und menschlich haben reifen lassen.

Bei Frau Professor Dr. Hassel möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und das zur Verfügung stellen der Räumlichkeiten bedanken. Außerdem möchte ich mich herzlich für die Übernahme der Zweitkorrektur bedanken.

Frau Professor Dr. Renkawitz-Pohl und Herr Professor Dr. Homberg möchte ich danken, dass sie sich bereit erklärt haben Mitglieder meines Prüfungskomitees zu werden.

Ein großer Dank gilt allen Mitgliedern der AG Hassel, die mir mit Rat, guten Hinweisen, viel Hilfe und vielen schönen Momenten die Arbeit sehr erleichtert haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Martina Podleschny die mir bei der Anfertigung der Westernblots hilfreich mit Rat und Material zur Seite stand. Außerdem möchte ich mich bei ihr auch für ihr offenes Ohr und ihre Ratschläge bedanken.

Ebenfalls gebührt mein Dank Katja Gessner. Neben dem ‚mal eben‘ bestellen von wichtigen Dingen waren auch die Kaffeepausen ungemein hilfreich.

Martin Kollman gebührt mein Dank für die Einweisung am KLSM und die guten Gespräche dabei. Ebenso gilt mein Dank ihm und allen Mitgliedern seiner AG, die mich auf DZG Tagungen immer so nett aufgenommen haben.

Ein sehr großes Danke mit einem ebenso großen Flausch gilt den tapferen Reckinen Dixi, Jessi, Johanna und Nina! Ohne euch wärs wohl der Vulkan geworden:)

Das Beste zum Schluss, ich danke meinem großartigen Mann Jakub. Für das Unterstützen, Nachts mit zur Uni fahren, zuhören, da sein, mich ertragen, mich aufbauen, alles nochmal lesen und den Glauben an mich. Dziękuję moja miłość.

### 6.11 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Beteiligte Signalwege an der Entstehung der Urkeimzellen in  
*Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta)

unter der Leitung von Frau Dr. Nicole Rebscher (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei

keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen

Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

---

Anika Lidke